

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

**EP 0 712 934 A2**

(12)

**EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

(43) Veröffentlichungstag:  
22.05.1996 Patentblatt 1996/21

(21) Anmeldenummer: 95117316.0

(22) Anmeldetag: 03.11.1995

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>: **C12N 15/62**, C12N 9/72,  
C12N 9/64, C07K 14/81,  
C07K 14/815, C07K 14/705,  
A61K 38/49, A61K 38/57,  
A61K 38/58

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE CH DE DK ES FR GB GRIE IT LI LU MC NL  
PT SE**

(30) Priorität: 17.11.1994 DE 4440892

(71) Anmelder: Grünenthal GmbH  
D-52078 Aachen (DE)

(72) Erfinder:  
• Wnendt, Stephan, Dr.  
D-52076 Aachen (DE)  
• Heinzel-Wieland, Regina, Dr.  
D-64295 Darmstadt (DE)  
• Steffens, Gerd Josef, Prof. Dr.  
D-52072 Aachen (DE)

(54) **Proteine mit fibrinolytischen und gerinnungshemmenden Eigenschaften**

(57) Es werden Proteine mit fibrinolytischen und gerinnungshemmenden Eigenschaften beschrieben, die am N- und/oder C-terminalen Ende der Plasminogen aktivierenden Aminosäuresequenz mit einer Thrombin oder Faktor Xa hemmenden Aminosäuresequenz verknüpft sind. Die Proteine, die gentechnisch hergestellt werden, eignen sich als Thrombolytika.

**EP 0 712 934 A2**

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft Proteine mit fibrinolytischen und gerinnungshemmenden Eigenschaften, die am N- und/oder C-terminalen Ende der Plasminogen aktivierenden Aminosäuresequenz mit einer Thrombin und/oder Faktor Xa hemmenden Aminosäuresequenz verknüpft sind, Plasmide zur Herstellung dieser Polypeptide sowie Thrombolytika, die als Wirkstoff ein derartiges Polypeptid enthalten.

Eine Vielzahl schwerwiegender Erkrankungen ist auf den Verschuß arterieller oder venöser Blutgefäße zurückzuführen. Zu diesen thrombotischen Erkrankungen gehören Herzinfarkt, Hirninfarkt, Lungenembolie, tiefe Venenthrombose und periphere, arterielle Verschlusskrankungen. Durch den Verschuß der Blutgefäße wird die Versorgung des entsprechenden Gewebes mit Sauerstoff sowie der Austausch von Nährstoffen und Metaboliten unterbrochen, so daß es zu irreversiblen Schäden des betreffenden Organs oder Gewebes kommen kann.

Der durch einen Thrombus hervorgerufene Verschuß eines Blutgefäßes bildet sich meist an einer arteriosklerotischen Läsion aus Fibrin, Thrombozyten und Erythrozyten unter Einwirkung verschiedener Enzyme des Blutgerinnungssystems. Innerhalb der Enzymkaskade des Gerinnungssystems spielen Faktor Xa und Thrombin eine prominente Rolle. Faktor Xa setzt als Bestandteil des Prothrombinase-Komplexes Prothrombin zu Thrombin um. Thrombin kann alle wichtigen Enzyme des Gerinnungssystems aktivieren, die Aggregation von Thrombozyten induzieren und zur Bildung eines Fibrinnetzes durch Umsetzung von Fibrinogen zu Fibrin führen (Furie und Furie in *New Engl. J. Med.* **326**, 800 (1992)).

Die Bildung von Thromben wird durch physiologische Antikoagulantien, beispielsweise Antithrombin III, aktiviertes Protein C und Tissue Factor Pathway Inhibitor, begrenzt. Einmal gebildete Thromben können durch Einwirkung von körpereigenem Plasmin wieder aufgelöst werden. Plasmin entsteht aus einem inaktiven Proenzym, dem Plasminogen, das durch Plasminogenaktivatoren proteolytisch aktiviert wird. Die durch Plasmin hervorgerufene Thrombolyse wird therapeutisch genutzt, indem Patienten mit thrombotischen Erkrankungen, insbesondere Patienten mit akutem Herzinfarkt, mit Plasminogenaktivatoren behandelt werden. Zur Zeit stehen für diese Therapie Streptokinase, APSAC (Anisolated Plasminogen Streptokinase Activator Complex), zweikettige Urokinase (UK), rekombinante, einkettige Urokinase (rekombinante Prourokinase) und Gewebeplasminogenaktivator (t-PA) zur Verfügung (Collen und Lijnen in *Blood* **78**, 3114 (1991)). In der Entwicklung befinden sich Fledermaus-Plasminogenaktivatoren (Gardell et al. in *J. Biol. Chem.* **264**, 17947 (1989); EP 383 417), Staphylokinase (Schlott et al. in *Bio/Technology* **12**, 185 (1994); Collen und Van De Werf in *Circulation* **87**, 1850 (1993)), der rekombinante Gewebeplasminogenaktivator BM 06.022 (Martin et al. in *J. Cardiovasc. Pharm.* **18**, 111 (1991)) sowie die t-PA-Variante TNK-t-PA (Keyt et al. in *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 3670 (1994)).

Streptokinase, ein Protein hämolytischer Streptokokken, aktiviert humanes Plasminogen, indem es einen Komplex mit Plasminogen bildet und dadurch das Plasminogen in eine aktive Konformation überführt. Dieser Komplex selbst setzt freies Plasminogen zu Plasmin um, welches dann wiederum das an Streptokinase gebundene Plasminogen spaltet. Ähnlich wirkt auch Staphylokinase, ein aus *Staphylococcus aureus* gewonnenes Protein, das jedoch im Vergleich zu Streptokinase eine höhere Fibrinspezifität besitzt. Eine Weiterentwicklung der Streptokinase ist APSAC, eine in-vitro hergestellte Verbindung aus Streptokinase und menschlichem Plasminogen. APSAC besitzt aufgrund einer chemischen Modifikation des aktiven Zentrums des Plasminogens eine gegenüber Streptokinase erhöhte biologische Halbwertszeit.

Urokinase ist ein menschliches Protein, das in zwei Formen als proteolytisch aktives Protein aus Urin gewonnen werden kann: der hochmolekularen Urokinase (HUK) und der niedermolekularen Urokinase (LUK) (Stump et al. in *J. Biol. Chem.* **261**, 1267 (1986)). HUK und LUK sind aktive Formen der Urokinase, d. h. Zweikettenmoleküle. Die Urokinase wird als einkettige Urokinase (Prourokinase) in verschiedenen Geweben gebildet und kann als Proenzym in geringen Mengen im menschlichen Blut nachgewiesen werden (Wun et al. in *J. Biol. Chem.* **257**, 3276 (1982)). Die aktivierte Form der Prourokinase hat als HUK ein Molekulargewicht von 54 Kilodalton und besteht aus 3 Domänen: der amino-terminalen Growth-Factor-Domäne, dem Kringel und der Serin-Protease-Domäne (Günzler et al. in *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **363**, 1155 (1982); Steffens et al. in *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **363**, 1043 (1982)). Obwohl Prourokinase und Plasminogen als Proenzyme vorliegen, ist die Prourokinase aufgrund einer intrinsischen Aktivität in der Lage, Plasminogen in aktives Plasmin umzuwandeln. Die volle Aktivität erhält dieser Plasminogenaktivator aber erst, nachdem das gebildete Plasmin seinerseits die Prourokinase zwischen <sup>158</sup>Lysin und <sup>159</sup>Isoleucin gespalten hat (Lijnen et al. in *J. Biol. Chem.* **261**, 1253 (1986)). Die gentechnische Gewinnung von Urokinase in *Escherichia coli* wurde erstmals von Heyneker et al. beschrieben (Proceedings of the IVth International Symposium on Genetics of Industrial Microorganisms 1982). Unglycosylierte Prourokinase (Saruplase) wird unter Verwendung eines synthetischen Gens hergestellt (Brigelius-Flohé et al. in *Appl. Microbiol. Biotech.* **36**, 640 (1992)).

t-PA ist ein im Blut und im Gewebe vorkommendes Protein mit einem Molekulargewicht von 72 Kilodalton. Dieser Plasminogenaktivator besteht aus 5 Domänen: der amino-terminalen Finger-Domäne, der Growth-Factor-Domäne, dem Kringel 1, dem Kringel 2 und der Serin-Protease-Domäne. Wie Prourokinase wird t-PA durch eine plasminkatalysierte Spaltung zwischen Kringel 2 und der Serin-Protease-Domäne, d. h. zwischen <sup>275</sup>Arg und <sup>276</sup>Ile, in die aktive zweikettige Form überführt. In vitro-Studien und tierexperimentelle Ergebnisse weisen darauf hin, daß t-PA an Fibrin bindet und in seiner enzymatischen Aktivität durch Fibrin stimuliert wird (Collen und Lijnen in *Blood* **78**, 3114 (1991)). Durch die Fibrin-

spezifität von t-PA sollte vermieden werden, daß Plasmin im gesamten Blutsystem gebildet und in der Folge nicht nur Fibrin, sondern auch Fibrinogen abgebaut wird. Eine solche systemische Plasminogenaktivierung sowie ein starker Abbau des Fibrinogens sind unerwünscht, da dies das Blutungsrisiko erhöht. Allerdings zeigte sich in der therapeutischen Praxis, daß die aus den präklinischen Studien abgeleiteten Erwartungen hinsichtlich der Fibrinspezifität von t-PA nicht erfüllt werden. Aufgrund der kurzen biologischen Halbwertszeit von t-PA müssen hohe Dosen infundiert werden, die trotz der Fibrinspezifität zu einer systemischen Plasminogenaktivierung führen (Keyt et al. in Proc. Natl. Acad. Sci. 91, 3670 (1994)).

r-PA und TNK-t-PA sind t-PA-Varianten mit verbesserten Eigenschaften. Beim r-PA (BM 06.022) wurden die ersten drei t-PA-Domänen, d. h. die Fingerdomäne, die Growth-Factor-Domäne und der erste Kringel deletiert, so daß das verkürzte Molekül nur den zweiten Kringel und die Protease-Domäne enthält. r-PA wird gentechnisch in *Escherichia coli* hergestellt und ist nicht glykosyliert. Im Vergleich zu t-PA hat r-PA eine längere biologische Halbwertszeit und führt schneller zur Reperfusion. In Tierexperimenten zeigte sich, daß r-PA als Bolus appliziert gleich wirksam ist wie eine t-PA-Infusion (Martin et al. in J. Cardiovasc. Pharmacol. 18, 111 (1991)).

Die t-PA-Variante TNK-t-PA unterscheidet sich von natürlichem t-PA in drei Punkten: Austausch von <sup>103</sup>Threonin gegen Asparagin, wodurch eine neue Glykosylierungsstelle entstanden ist; Austausch von <sup>117</sup>Asparagin gegen Glutamin, wodurch eine Glykosylierungsstelle entfernt ist und Austausch der Sequenz zwischen <sup>296</sup>Lysin und <sup>299</sup>Arginin gegen vier aufeinanderfolgende Alanin-Einheiten. Die Kombination dieser drei Mutationen ergibt ein Polypeptid mit höherer Fibrinspezifität und längerer biologischer Halbwertszeit verglichen mit natürlichem t-PA. Darüber hinaus ist TNK-t-PA wesentlich schlechter durch PAI-1 zu hemmen als natürliches t-PA (Keyt et al. in Proc. Natl. Acad. Sci. 91, 3670 (1994)). Tierexperimentelle Ergebnisse, die mit einem Vorläufer von TNK-t-PA erzielt wurden, weisen darauf hin, daß sich TNK-t-PA zur Bolusapplikation eignet (Refino et al. in Thromb. Haemost. 70, 313 (1993)).

Der Fledermausplasminogenaktivator (bat-PA) kommt im Speichel der Fledermaus *Desmodus rotundus* vor. Dieser inzwischen auch gentechnisch hergestellte Plasminogenaktivator hat eine noch ausgeprägtere Fibrinspezifität als t-PA und zeigt im Tierversuch eine verbesserte Thrombolyse bei erhöhter biologischer Halbwertszeit und verminderter systemischer Plasminogenaktivierung (Gardell et al. in Circulation 84, 244 (1991)).

Bei der Behandlung thrombotischer Erkrankungen werden Plasminogenaktivatoren in der Regel zusammen mit einer antikoagulativen Substanz, beispielsweise Heparin, verabreicht. Dadurch wird eine bessere Thrombolyse erreicht als bei alleiniger Behandlung mit einem Plasminogenaktivator (Tebbe et al. in Z. Kardiol. 80, Suppl. 3, 32 (1991)). Verschiedene Befunde aus der Klinik weisen darauf hin, daß parallel zur Auflösung der Thromben eine erhöhte Gerinnungsneigung auftritt (Szczeklik et al. in Arterioscl. Thromb. 12, 548 (1992); Goto et al. in Angiology 45, 273 (1994)). Es wird angenommen, daß hierfür Thrombinmoleküle verantwortlich sind, die im Thrombus eingeschlossen sind und bei der Auflösung des Gerinnsels wieder freigesetzt werden. Desweiteren gibt es Hinweise, daß auch Plasminogenaktivatoren selbst die Aktivierung von Prothrombin beschleunigen und damit der Thrombolyse entgegenwirken (Brommer und Meijer in Thromb. Haemostas. 70, 995 (1993)). Antikoagulative Substanzen wie Heparin, Hirugen, Hirudin, Argatroban, Protein C und rekombinantes Tick Anticoagulant Peptide (TAP) können die verstärkte Reokkusionsneigung während der Thrombolyse unterbinden und damit den Erfolg der Lysetherapie verbessern (Yao et al. in Am. J. Physiol. 262 (Heart Circ. Physiol. 31) H 347 - H 379 (1992); Schneider in Thromb. Res. 64, 667 (1991); Gruber et al. in Circulation 84, 2454 (1991); Martin et al. in J. Am. Coll. Cardiol. 22, 914 (1993); Vlasuk et al. in Circulation 84, Suppl. II-467 (1991)).

Einer der stärksten Thrombininhibitoren ist das aus 65 Aminosäuren bestehende Hirudin aus dem Blutegel *Hirudo medicinalis*. Es gibt verschiedene Hirudin-Isoformen, die sich in einigen Aminosäuren unterscheiden. Alle Hirudin-Isoformen blockieren sowohl die Anbindung des Thrombins an ein Substrat, beispielsweise Fibrinogen, als auch das aktive Zentrum des Thrombins (Rydel et al. in Science 249, 277 (1990); Bode und Huber in Molecular Aspects of Inflammation, Springer, Berlin, Heidelberg, 103 - 115 (1991); Stone und Hofsteenge in Prot. Engineering 2, 295 (1991); Dodt et al. in Biol. Chem. Hoppe-Seyler 366, 379 (1985). Darüber hinaus sind vom Hirudin abgeleitete kleinere Moleküle bekannt, die ebenfalls thrombininhibitorische Aktivität besitzen (Maraganore et al. in Biochemistry 29, 7095 (1990); Krstenansky et al. in J. Med. Chem. 30, 1688 (1987); Yue et al. in Prot. Engineering 5, 77 (1992)).

Die Verwendung von Hirudin in Kombination mit einem Plasminogenaktivator zur Behandlung thrombotischer Erkrankungen ist in den europäischen Patentanmeldungen EP 328 957 und EP 365 468 beschrieben. Die Verwendung von Hirudin-Derivaten in Kombination mit einem Thrombolytikum ist aus der internationalen Patentanmeldung WO 91/01142 bekannt.

Hirullin ist ein aus dem Blutegel *Hirudo manillensis* isoliertes Protein mit 61 Aminosäuren. Hirullin gleicht in seiner Wirkung und Inhibitorstärke Hirudin, weicht jedoch in der Aminosäuresequenz stark von Hirudin ab. Auch von Hirullin konnten kleinere Moleküle abgeleitet werden, die Thrombin sehr gut hemmen (Krstenansky et al. in Fabs Lett. 269, 465 (1990)).

Desweiteren kann Thrombin auch durch ein Peptid gehemmt werden, das sich aus der amino-terminalen Sequenz des humanen Thrombinrezeptors ableitet (Vu et al. in Nature 253, 674 (1991)). Der Thrombinrezeptor enthält in der extrazellulären, amino-terminalen Region eine thrombinbindende Sequenz mit benachbarter Spaltstelle für Thrombin. Diese Sequenz kann Thrombin hemmen, sofern die Spaltstelle durch einen Austausch von <sup>42</sup>Serin in <sup>42</sup>Phenylalanin maskiert ist.

Bei Antistasin und TAP handelt es sich um Inhibitoren von Faktor Xa. Antistasin ist ein 119 Aminosäuren umfassendes Protein aus dem Blutegel *Haementeria ghiliani*, das keine Sequenzhomologie mit Hirudin aufweist (Tuszynski et al. in J. Biol. Chem. **262**, 9718 (1987); Nutt et al. in J. Biol. Chem. **263**, 10162 (1988); Condra et al. in Thromb. Haemostas. **61**, 437 (1989)). Die rekombinante Herstellung von Antistasin wurde von Han et al. in Gene **75**, 47 (1989) beschrieben.

TAP ist ein 60 Aminosäuren umfassendes Protein aus der Zecke *Onithodoros moubata*, das auch gentechnisch hergestellt werden kann. TAP bindet reversibel an Faktor Xa und wirkt dadurch der Bildung von Thrombin entgegen. In verschiedenen Thrombosemodellen erwies sich TAP als ähnlich wirksam wie Hirudin oder Heparin (Vlasuk in Thromb. Haemost. **70**, 212 (1993); Schaffer et al. in Circulation **84**, 1741 (1991)).

Phaneuf et al. beschreiben in Thromb. Haemost. **71**, 481 (1994) einen Komplex, der aus einer zufälligen chemischen Verknüpfung von Streptokinase und Hirudin besteht. Die Fähigkeit, Plasminogen zu aktivieren, liegt jedoch bei diesem Streptokinase-Hirudin-Komplex um den Faktor 8 unter der unmodifizierten Streptokinase.

Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe bestand in der Entwicklung von Wirkstoffen zur Behandlung thrombotisch bedingter Gefäßverschlüsse, die innerhalb sehr kurzer Zeit eine vollständige Thrombolysen bewirken und gleichzeitig den Wiederverschluß der Gefäße nach zunächst erfolgreicher Thrombolysen verhindern. Ferner soll mit diesen Wirkstoffen eine systemische Plasminogenaktivierung vermieden werden.

Es wurde nun gefunden, daß die an solche Wirkstoffe gestellten hohen Anforderungen von Proteinen mit fibrinolytischen Eigenschaften erfüllt werden, die am N- und/oder C-terminalen Ende der Plasminogen aktivierenden Aminosäuresequenz eine Thrombin- und/oder Faktor Xa hemmende Aminosäuresequenz besitzen.

Gegenstand der Erfindung sind dementsprechend Proteine mit fibrinolytischen und gerinnungshemmenden Eigenschaften, die am N- und/oder C-terminalen Ende der Plasminogen aktivierenden Aminosäuresequenz mit einer Thrombin und/oder Faktor Xa hemmenden Aminosäuresequenz verknüpft sind, wobei solche Proteine ausgeschlossen sind, in denen die Plasminogen aktivierende Aminosäuresequenz <sup>47</sup>Ser bis <sup>411</sup>Leu der unglycosylierten Prourokinase am C-terminalen Ende mit einer Peptidsequenz der Formel

T<sub>1</sub>-Arg-Pro-T<sub>2</sub>-Gly-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-  
Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-T<sub>3</sub>

(SEQ ID NO: 1)

oder

T<sub>1</sub>-Arg-Pro-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-Pro-Asn-Asp-Lys-Tyr-Glu-  
Pro-Phe-Trp-Glu-Asp-Glu-Glu-Lys-Asn-Glu

(SEQ ID NO: 2)

oder

T<sub>1</sub>-Arg-Pro-Ser-Ser-Glu-Phe-Glu-Glu-Phe-Glu-Ile-Asp-Glu-  
Glu-Glu-Lys

(SEQ ID NO: 3)

mit T<sub>1</sub> Pro oder Val, T<sub>2</sub> Leu oder eine direkte Bindung zwischen Pro und Gly und T<sub>3</sub> Gln oder eine Hydroxylgruppe verknüpft ist.

Bevorzugte Proteine mit fibrinolytischen und gerinnungshemmenden Eigenschaften enthalten als Plasminogen aktivierende Aminosäuresequenz die unveränderte Aminosäuresequenz der Prourokinase, mindestens eine durch Dele-

tion, Substitution, Insertion und/oder Addition modifizierte Aminosäuresequenz der Prourokinase, die unveränderte Aminosäuresequenz der Urokinase, mindestens eine durch Deletion, Substitution, Insertion und/oder Addition modifizierte Aminosäuresequenz der Urokinase, die unveränderte Aminosäuresequenz des Gewebefibrinolytischen Plasminogenaktivators (t-PA), mindestens eine durch Deletion, Substitution, Insertion und/oder Addition modifizierte Aminosäuresequenz von t-PA, die unveränderte Aminosäuresequenz des Fledermaus-Plasminogenaktivators (bat-PA), mindestens eine durch Deletion, Substitution, Insertion und/oder Addition modifizierte Aminosäuresequenz von bat-PA, und/oder die Aminosäuresequenz von Streptokinase, Staphylokinase und/oder APSAC.

Die Plasminogen aktivierende Aminosäuresequenz in den erfindungsgemäßen Proteinen enthält insbesondere die unveränderte Aminosäuresequenz von Prourokinase, mindestens eine durch Deletion, Substitution, Insertion und/oder Addition modifizierte Aminosäuresequenz der Prourokinase, die unveränderte Aminosäuresequenz von t-PA und/oder mindestens eine durch Deletion, Substitution, Insertion und/oder Addition modifizierte Aminosäuresequenz von t-PA. Besonders bevorzugt werden Proteine, deren Plasminogen aktivierende Aminosäuresequenz aus der unveränderten, aus 411 Aminosäuren bestehenden Sequenz der Prourokinase, aus der Aminosäuresequenz 47Ser bis 411Leu der Prourokinase, aus der Aminosäuresequenz 138Ser bis 411Leu der Prourokinase, aus der unveränderten, aus 527 Aminosäuren bestehenden Sequenz von t-PA, aus der Aminosäuresequenz Ser-89Arg bis 527Pro von t-PA und/oder aus der Aminosäuresequenz 174Ser bis 527Pro von t-PA besteht.

Die Thrombin und/oder Faktor Xa hemmende Aminosäuresequenz der erfindungsgemäßen Proteine enthält vorzugsweise mindestens eine Aminosäuresequenz mit Hirudin-Eigenschaften, mindestens eine vom humanen Thrombinrezeptor abgeleitete Aminosäuresequenz, mindestens eine Aminosäuresequenz mit Hirullin-Eigenschaften, Antistasin und/oder Tick Antikoagulant Peptide (TAP). Besonders bevorzugt enthält die Thrombin und/oder Faktor Xa hemmende Aminosäuresequenz mindestens eine Aminosäuresequenz mit Hirudin-Eigenschaften, mindestens eine vom humanen Thrombinrezeptor abgeleitete Aminosäuresequenz und/oder mindestens eine Aminosäuresequenz mit Hirullin-Eigenschaften.

Insbesondere enthält die Thrombin und/oder Faktor Xa hemmende Aminosäuresequenz als Aminosäuresequenz mit Hirudin-Eigenschaften die aus 65 Aminosäuren bestehende Sequenz des Hirudins und/oder mindestens eine Aminosäuresequenz der Formeln

T<sub>1</sub>-Arg-Pro-T<sub>2</sub>-Gly-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-T<sub>3</sub>  
(SEQ ID NO: 45)

und/oder

T<sub>4</sub>-Ile-Thr-Tyr-Thr-Asp-Cys-Thr-Glu-Ser-Gly-Gln-Asn-Leu-Cys-Leu-Cys-Glu-Gly-Ser-Asn-Val-Cys-Gly-Lys-Gly-Asn-Lys-Cys-Ile-Leu-Gly-Ser-Asp-Gly-Lys-Gly-Asn-Gln-Cys-Val-Thr-Gly-Glu-Gly-Thr-Pro-Lys-Pro-Glu-Ser-His-Asn-Asp-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln  
(SEQ ID NO: 4)

und/oder

als Aminosäuresequenz, die sich vom humanen Thrombinrezeptor ableitet, mindestens eine Aminosäuresequenz der Formeln

T<sub>1</sub>-Arg-Pro-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-Pro-Asn-Asp-Lys-Tyr-Glu-  
 5 Pro-Phe-Trp-Glu-Asp-Glu-Glu-Lys-Asn-Glu  
 (SEQ ID NO:2)

10 und/oder

15 T<sub>5</sub>-Ser-Asn-Glu-Leu-Asp-Pro-Arg-Pro-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-  
 Pro-Asn-Asp-Lys-Tyr-Glu-Pro-Phe-Trp-Glu-Asp-Glu-Glu-Lys-  
 Gly-Pro-His-Met  
 (SEQ ID NO:5)

20 und/oder  
 als Aminosäuresequenz mit Hirullin-Eigenschaften mindestens eine Aminosäuresequenz der Formeln

25 T<sub>1</sub>-Arg-Pro-Ser-Ser-Glu-Phe-Glu-Glu-Phe-Glu-Ile-Asp-Glu-  
 Glu-Glu-Lys  
 30 (SEQ ID NO:3)

und/oder

35 T<sub>1</sub>-Arg-Pro-T<sub>2</sub>-Gly-Gly-Gly-Gly-Pro-Ser-Asp-Phe-Glu-Glu-Phe-  
 40 Ser-Leu-Asp-Asp-Ile-Glu-Gln  
 (SEQ ID NO:6)

45 In diesen Aminosäuresequenzen steht T<sub>1</sub> für Pro oder Val, T<sub>2</sub> für Leu oder eine direkte Bindung zwischen Pro und Gly,  
 T<sub>3</sub> für Gln, eine Hydroxylgruppe oder eine direkte Bindung zur benachbarten Aminosäure, T<sub>4</sub> für Met, Ile oder eine  
 direkte Bindung zur benachbarten Aminosäure und T<sub>5</sub> für Met oder eine direkte Bindung zur benachbarten Aminosäure.

Die Plasminogen aktivierende Aminosäuresequenz ist über ihr N- und/oder C-terminales Ende mit einer Thrombin  
 und/oder Faktor Xa hemmenden Aminosäuresequenz direkt, über die Aminosäure Isoleucin oder über eine Peptidse-  
 50 quenz der allgemeinen Formeln

Ser-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub> (SEQ ID NO:7)

oder

Ile-Ser-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub> (SEQ ID NO:8)

55 verknüpft. Die Variablen der Brückensequenzen haben folgende Bedeutungen: X<sub>1</sub> Pro oder Leu, X<sub>2</sub> Gly, Val oder Pro,  
 X<sub>3</sub> Lys, Val, Arg, Gly oder Glu, X<sub>4</sub> Ala, Val, Gly, Leu oder Ile, X<sub>5</sub> Gly, Phe, Trp, Tyr oder Val, X<sub>6</sub> Gly, Pro oder eine direkte  
 Bindung zu der benachbarten Aminosäure und X<sub>7</sub> Ile oder eine direkte Bindung zu der benachbarten Aminosäure.

Im Vergleich zu bekannten Plasminogenaktivatoren, zu bekannten Mischungen aus einem Plasminogenaktivator  
 und einem Thrombininhibitor sowie zu dem bekannten Streptokinase-Hirudin-Komplex zeichnen sich die erfindungsge-  
 mäßigen Proteine durch eine stärkere fibrinolytische Wirkung, verbunden mit überraschend guten Thrombin inhibierenden

Eigenschaften aus. Darüber hinaus wird von den erfindungsgemäßen Polypeptiden Plasmafibrinogen in deutlich geringeren Mengen verbraucht. Die hieraus resultierende signifikant höhere Fibrinspezifität, insbesondere auch im Vergleich zu den bekannten Mischungen eines Plasminogenaktivators und eines Thrombininhibitors, bewirkt, daß die Gerinnungsfähigkeit des Blutes nur wenig beeinflußt wird und die Gefahr von unkontrollierten Blutungen als mögliche Komplikation eines systemischen Fibrinogenabbaus minimiert ist. Die hohe Fibrinspezifität der erfindungsgemäßen Proteine ermöglicht somit Bolusapplikationen mit deutlich herabgesetzten Blutungsrisiko im Vergleich zu Bolusapplikationen bekannter Thrombolytika.

Weiterer Erfindungsgegenstand sind dementsprechend Thrombolytika, die als Wirkstoff ein erfindungsgemäßes Protein enthalten.

Zur Behandlung thrombotisch bedingter Gefäßverschlüsse, beispielsweise Herzinfarkt, Hirninfarkt, peripherer, akuter Arterienverschuß, Lungenembolie und tiefe Bein- und Beckenvenenthrombose, werden 0,1 bis 1 mg pro kg eines erfindungsgemäßen Polypeptides benötigt. Die erfindungsgemäßen Proteine können parenteral durch Bolusinjektion oder Infusion verabreicht werden. Erfindungsgemäße Proteine, deren gerinnungshemmende Eigenschaften ausschließlich auf thrombininhibierende Aminosäuresequenzen oder auf Thrombin und Faktor Xa hemmende Aminosäuresequenzen zurückzuführen sind, eignen sich insbesondere zur Behandlung akuter Zustände, beispielsweise zur Behandlung des Herzinfarktes. Erfindungsgemäße Proteine, deren gerinnungshemmende Eigenschaften ausschließlich auf Faktor Xa hemmende Aminosäuresequenzen zurückzuführen sind, eignen sich insbesondere zur Behandlung chronischer thrombotischer Erkrankungen, beispielsweise tiefe Venenthrombose oder instabile Angina Pectoris.

Die erfindungsgemäßen Thrombolytika enthalten neben mindestens einem erfindungsgemäßen Polypeptid Hilfsstoffe, beispielsweise Trägermaterialien, Lösungsmittel, Verdünnungsmittel, Farbstoffe und Bindemittel. Die Auswahl dieser Hilfsstoffe sowie die einzusetzenden Mengen derselben hängt davon ab, wie das Arzneimittel appliziert werden soll und bereitet dem Fachmann keinerlei Probleme.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Proteine erfolgt mittels gentechnischer Verfahren. Dazu werden die entsprechenden Gene aus synthetischen Oligonukleotiden in geeignete Plasmide cloniert und unter Kontrolle des trp- oder tac-Promotors, insbesondere unter Kontrolle des trp-Promotors, in *Escherichia coli* exprimiert.

Erfindungsgegenstand sind dementsprechend auch Plasmide zur Verwendung bei der Herstellung erfindungsgemäßer Proteine, deren Operon einen regulierbaren Promotor, eine als Ribosomenbindestelle wirksame Shine-Dalgarno-Sequenz, ein Startcodon, ein synthetisches Strukturgen für ein erfindungsgemäßes Protein und stromabwärts vom Strukturgen ein oder zwei Terminatoren aufweist.

Die Expression der erfindungsgemäßen Plasmide wird in *Escherichia coli*-Stämmen, insbesondere in *Escherichia coli*-Stämmen der Gruppe K 12, beispielsweise *E. coli* K 12 JM 101 (ATCC 33876), *E. coli* K 12 JM 103 (ATCC 39403), *E. coli* K 12 JM 105 (DSM 4162) und *E. coli* K 12 DH 1 (ATCC 33849) durchgeführt. In der bakteriellen Zelle fallen die erfindungsgemäßen Polypeptide in hoher Ausbeute in Einschußkörpern an, in denen das Protein in denaturierter Form vorliegt. Nach Isolierung der Einschußkörper wird das denaturierte Protein proteinchemisch unter Einwirkung eines Redox-Systems in die gewünschte Tertiärstruktur zurückgefaltet.

## Beispiele

### 1. Darstellung, Isolierung und Reinigung erfindungsgemäßer Proteine

#### a) Klonierungsarbeiten

Die Expressionsplasmide für die gentechnische Herstellung der erfindungsgemäßen Polypeptide in *Escherichia coli* wurden in an sich bekannter Weise hergestellt. Die Abfolge der einzelnen Herstellungsschritte ist in den Abbildungen 1 bis 17 dargestellt. Ausgangsprodukte der Plasmidherstellung waren die Plasmide pBlueskript KS II+ (Firma Stratagene, Heidelberg), pUC8 und pSL1190 (Fa. Pharmacia, Freiburg) sowie pGR201. pGR201 ist identisch mit dem in EP 408 945 und Appl. Microbiol. Biotechn. 36, 640 - 649 (1992) beschriebenen Plasmid pBF160. Die Restriktionsendonukleasen BanII, BamHI, ClaI, HindIII, NcoI, NdeI, NheI, NotI, SacI und XbaI sowie die DNA-modifizierenden Enzyme, wie die alkalische Phosphatase, T4-Ligase, T4-Kinase und T7-Polymerase, wurden von den Firmen Pharmacia, Stratagene, Boehringer Mannheim und Gibco (EGGSTEIN) bezogen. Die Veränderungen der Plasmide während ihrer Herstellung wurden durch Restriktionsanalyse und DNA-Sequenzierung überprüft. Die DNA-Sequenzierung wurde nach den Vorschriften des Herstellers mit einer Reagenziensammlung der Firma Pharmacia durchgeführt. Bei der Herstellung der Plasmide wurden verschiedene Oligodesoxyribonukleotide (Oligos) eingesetzt, deren Sequenzen zusammen mit den zugehörigen Bezeichnungen in Tabelle 1 angegeben sind.

Die Oligodesoxyribonukleotide wurden in detrithylierter Form im 0,1 µMol-Maßstab mit einem Synthesizer (Modell 391) der Firma Applied Biosystems (Weiterstadt) nach den Angaben des Herstellers unter Verwendung von β-cyanoethyl-geschützten Diisopropylaminophosphoramiditen gefertigt. Je 100 pmol Oligodesoxyribonukleotid wurden in 50 mM Tri(hydroxymethyl)aminomethan/HCl (Tris/HCl), 10 mM Magnesiumchlorid und 5 mM Dithiothreitol bei einem pH-Wert von 7,5 mit einer Enzymeinheit T4-Kinase in Anwesenheit von 10 mM Aden-



osin triphosphat phosphoryliert und anschließend im gleichen Puffer zu doppelsträngigen DNA-Molekülen umgeformt. Die erhaltenen synthetischen, doppelsträngigen DNA-Moleküle wurden durch Gelelektrophorese auf einem Polyacrylamidgel (5% Polyacrylamid) gereinigt und anschließend in die Ligation mit den entsprechend vorbereiteten Plasmiden eingesetzt. Die Vorbereitung der Plasmide durch Verdauung mit Restriktionsenzymen, Isolierung der entsprechenden Restriktionsfragmente und Dephosphorylierung der 5'-Enden, die nachfolgende Ligation und die Transformation in E.coli K12 JM103 sowie alle weiteren gentechnischen Arbeiten wurden in an sich bekannter Weise durchgeführt und sind in Sambrook et al. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, USA, 1989 angegeben.

Tabelle 1:

Oligo	Sequenz von 5' nach 3' geschrieben
O 105 SEQ ID NO:9	TATGAGCAAACTTGCTACGAAGGTAACGGTCACTTCTACCGTG GTAAGGCTTCTACCGACAC
O 106 SEQ ID NO:10	CATGGTGTCTGGTAGAAGCCTTACCACGGTAGAAGTGACCGTTAC CTTCGTAGCAAGTTTTGCTCA
O 220 SEQ ID NO:11	CGGTTAAGGCTTTCCCGAGGCCTGGTGGTGGTAAACGGTGAC TTCGAAGAAATCCCGGAAGAGTACCTGTGATAGGATCAA
O 221 SEQ ID NO:12	CTAGTTGATCCTATCACAGGTACTCTTCCGGGATTTCTTCGAAG TCACCGTTACCACCACCACCAGGCCTCGGGAAAGCCTTAACCGG GCT

5	O 265 SEQ ID NO:13	CACCCGGCGGAGACGGCGGGCTCAGAGCCAGACCGTTTCTTCT TTGGTGTGAGAACG
	O 27-1 SEQ ID NO:14	TATGAGTAGTCCACCAGAAGAGCT
10	O 27-2 SEQ ID NO:15	GAGCTCTTCTGGTGGACTACTCA
	O 281 SEQ ID NO:16	CGTCCGGGTGGTGGTGGTAACGGTGACTTCGAAGAAATCCCGGA AGAATACCTGTAAG
15	O 282 SEQ ID NO:17	GATCCGTTCTCACACCAAGAAGAAAACGGTCTGGCTCTGAGCC CGCCGTCTCCGCCGGGTGGTTTCCCG
	O 283 SEQ ID NO:18	CTAGCTTACAGGTATTCTTCCGGGATTCTTCGAAGTCACCGTT ACCACCACCACCCGGACGCGGGAAAC
20	O 306 SEQ ID NO:19	ACGTAACCCGAATGACAAATACGAACCGTTCTGGGAAGATGAAG AGAAAGGGCCCCA
	O 307 SEQ ID NO:20	CTAGATAAGGAGGAAATAATATGAGCAATGAACTTGACCCGCGT CCGTTCTTGCT
25	O 308 SEQ ID NO:21	CATTCGGGTTACGTAGCAGGAACGGACGCGGGTCAAGTTCATTG CTCATATTATTCTCCTTAT
	O 309 SEQ ID NO:22	TATGGGGCCCTTTCTCTTCATCTTCCAGAACGGTTCGTATTTG T
30	O 329 SEQ ID NO:23	AAGAAATCCCGGAAGAATACCTGCAATAAG
	O 330 SEQ ID NO:24	CGGTTAAGGCTTGGGGACCGCGGCCGCTGGGTGGTGGTGGTAAC GGTGACTTCG
35	O 331 SEQ ID NO:25	ACCACCACCAGCGGCCGCGTCCCCAAGCCTTAACCGGGCT
	O 332 SEQ ID NO:26	CTAGCTTATTGCAGGTATTCTTCCGGGATTCTTCGAAGTCACC GTTACC
40	O 347 SEQ ID NO:27	CGGTTGTTGCTTTCCCGC
	O 348 SEQ ID NO:28	GGCCGCGGGAAAGCAACAACCGGGCT
45	O 572 SEQ ID NO:29	CATGGTGTCCGGTAGAAGCCTTACCACGGTAGAAGTGGCCGTTAC CTTCGTAGCAAGTTTAA
50	O 573 SEQ ID NO:30	GAGATCTGCAGGTATTCTTCCGGGATTCTTCGAAGTCACCGTC GTTGTGAGATTCC

55

O 574 SEQ ID NO:31	GGTTTCGGAGTACCTTCACCAGTAACGACCTGGTTACCTTTACC GTCG
O 575 SEQ ID NO:32	GATCCGACGGTAAAGGTAACCACTGCGTTACTGGTGAAGGTACT CCGAAACCGGAATCTCACAACGACG
O 576 SEQ ID NO:33	GCCACTTCTACCGTGGTAAGGCTTCTACCGACAC
O 577 SEQ ID NO:34	GTGACTTCGAAGAAATCCCGGAAGAATACCTGCAGATCTCTAAA ACTTGCTACGAAGGTAACG
O 583 SEQ ID NO:35	GCAAACGTTAGAACCTTCGCACAGGCACAGGTTCTGACCAGATT CAGTGCAGTCAGTGTACGTAATCA
O 584 SEQ ID NO:36	GATCCCAGGATGCATTTGTTACCTTTACC
O 585 SEQ ID NO:37	GAAGGTTCTAACGTTTGCGGTAAAGGTAACAAATGCATCCTGG
O 586 SEQ ID NO:38	TATGATTACGTACACTGACTGCACTGAATCTGGTCAGAACCTGT GCCTGTGC
O 616 SEQ ID NO:39	CTAGCTTATTGTTCAATGTTCGTCCAGAGAGAATTCTTCGAAGTC GCTCGGACCACCACCACCC
O 617 SEQ ID NO:40	GGCCGGGTGGTGGTGGTCCGAGCGACTTCGAAGAATTCTCTCTG GACGACATTGAACAATAAG

#### b) Herstellung von Dauerkulturen und Fermentation

Die rekombinanten Expressionsplamide pHW56 (M 43), pWLT27 (M 51), pWS1 (M 5112), pSE8 (M 36) wurden in E.coli K12 JM103 (ATCC 39403) eingebracht und auf Standard-I-Nähragar (Firma Merck, 150 mg/l Ampicillin) ausgestrichen (Sambrook et al. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual"). Jeweils eine einzelne Kolonie einer jeden Transformation wurde in Standard-I-Nährbouillon (Fa. Merck, pH 7,0; 150 mg/l Ampicillin) bei 20°C bis zur optischen Dichte (OD) von 1 bei 578 nm kultiviert, in Portionen von 2 ml als Dauerkultur unter Zusatz von Dimethylsulfoxid (DMSO) (7,5 % Endkonzentration) bei -70°C eingefroren und aufbewahrt. Zur Gewinnung der erfindungsgemäßen Polypeptide wurde jeweils 1 ml einer jeden Dauerkultur in 20 ml Standard-I-Nährbouillon (pH 7,0; 150 mg/l Ampicillin) suspendiert und bei 37°C bis zur OD von 1 bei 578 nm kultiviert.

Anschließend wurde die gesamte Menge der erhaltenen Kultur in 1 l Standard-I-Nährbouillon (pH 7,0; 150 mg/l Ampicillin) suspendiert und in Schüttelkolben bei 37°C fermentiert. Die Induktion erfolgte durch Zusatz von 2 ml Indolacrylessigsäurelösung (60 mg in 2 ml Ethanol) bei einer OD von 0,5 bis 1 bei 578 nm.

#### c) Expressionstestung

Zur Testung der Expressionsrate wurden unmittelbar vor der Induktion und jede Stunde nach der Induktion (insgesamt 6 Stunden) Zellen entsprechend 1 ml einer Zellsuspension mit einer OD von 1 bei 578 nm zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden mit Lysozym (1 mg Lysozym pro ml in 50 mM Tris/HCl-Puffer, pH 8,0, 50 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und 15 % Saccharose) aufgeschlossen. Das Homogenat der lysierten Zellen wurde in 4 - 5 M Guanidiniumhydrochloridlösung solubilisiert und nach Verdünnen auf 1,2 M Guanidiniumhydrochlorid unter Zusatz eines Reduktionsmittels (Glutathion oder Cystein) 2 - 5 Stunden der Rückfaltungsreaktion unterworfen (Winkler et al., Biochemistry 25 4041 bis 4045 (1986)). Die erhaltenen ein-

kettigen erfindungsgemäßen Polypeptide wurden durch Zugabe von Plasmin in die entsprechenden zweikettigen Moleküle umgewandelt, deren Aktivität mit dem chromogenen Substrat pyro-Glu-Gly-Arg-p-nitroanilid bestimmt wurde. Die Aktivierung der erfindungsgemäßen Polypeptide mit Plasmin erfolgte in 50 mM Tris/HCl-Puffer, 12 mM Natriumchlorid, 0,02 % Tween 80 bei pH 7,4 und 37°C. Das Verhältnis erfindungsgemäßes Polypeptid zu Plasmin lag bei etwa 8.000 - 36.000 zu 1, bezogen auf Enzymeinheiten. Die Testinkubation erfolgte in 50 mM Tris/HCl-Puffer und 38 mM Natriumchlorid bei pH 8,8 in Gegenwart von 0,36 µM Aprotinin (zur Hemmung des Plasmins) und 0,27 mM Substrat pyro-Glu-Gly-Arg-p-nitroanilid bei 37°C. In Abhängigkeit von der Konzentration an erfindungsgemäßigem Polypeptid wurde die Reaktion nach 5 bis 60-minütiger Inkubation durch Zusatz von 50 %-iger Essigsäure gestoppt und die Extinktion bei 405 nm gemessen. Gemäß den Angaben des Herstellers des Substrats (Kabi Vitrum, Schweden) entspricht bei dieser Vorgehensweise eine Extinktionsänderung von 0,05 pro Minute bei 405 nm einer Urokinase-Aktivität von 25 Ploug-Einheiten pro ml Testlösung. Die erfindungsgemäßen Polypeptide wiesen spezifische Aktivitäten zwischen 120.000 und 155.000 Ploug-Einheiten pro mg Protein auf. Der Proteingehalt der Lösungen wurde mit dem BCA-Assay der Firma Pierce bestimmt.

#### d) Isolierung und Reinigung

Nach 6 Stunden wurde die unter den in 1b) beschriebenen Bedingungen durchgeführte Fermentation beendet (Dichte 5 - 6 OD bei 578 nm), und die Zellen wurden durch Zentrifugation gewonnen. Das Zellsediment wurde in 200 ml Wasser resuspendiert und im Hochdruckhomogenisator aufgeschlossen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Niederschlag, der die gesamte Menge an einkettigem, erfindungsgemäßigem Polypeptid enthielt, in 500 ml 5 M Guanidiniumhydrochlorid, 40 mM Cystein, 1 mM EDTA bei einem pH-Wert von 8,0 gelöst und mit 2000 ml 25 mM Tris/HCl mit einem pH-Wert von 9,0 verdünnt. Die Rückfaltungsreaktion war nach ca. 12 Stunden abgeschlossen.

Die erhaltenen erfindungsgemäßen Polypeptide wurden nach Zusatz von 8 g Kieselgel durch 2-stündiges Rühren vollständig an Kieselgel gebunden. Das beladene Kieselgel wurde abgetrennt und mit Acetat-Puffer (pH 4,0) gewaschen. Die Polypeptide wurden mit 0,5 M Trimethylammoniumchlorid (TMAC) in 0,1 M Acetat-Puffer (pH 4) eluiert. Nach zwei chromatographischen Trennungen (Kupfer-Chelat-Säule und Kationenaustauscher) wurden die Polypeptide in reiner Form erhalten. Durch N-terminale Sequenzanalyse wurde die Einkettigkeit nachgewiesen.

Alle isolierten erfindungsgemäßen Polypeptide, deren Aminosäuresequenzen in den Abbildungen 18 bis 21 angegeben sind, zeigten in einem direkten Aktivitätstest mit dem chromogenen Substrat für Urokinase keine oder nur sehr geringe Aktivität (unter 1 %). Erst nach Spaltung mit Plasmin (Bedingungen sind in Abschnitt 1c) angegeben) wurde die volle Enzymaktivität erhalten. Die erfindungsgemäßen Polypeptide wurden demnach in E.coli K12 JM103 als einkettige Proteine exprimiert.

#### 2. Bestimmung der thrombinhemmenden Wirkung

Die Inhibitoraktivität der erfindungsgemäßen Polypeptide wurde durch Messung der Thrombinzeit bestimmt, indem 200 µl einer 1 : 10 Verdünnung an humanem Citratplasma in Veronalpuffer mit 50 µl Thrombinlösung (0,2 Einheiten) und 50 µl einer wäßrigen Lösung enthaltend 0,5 - 50 µg eines erfindungsgemäßen Polypeptides gemischt wurden. Dann wurde die Zeit bis zur Bildung eines Fibrinnetz gemessen. In Tabelle 2 sind die gemessenen Hemmfaktoren aufgeführt, die die Verlängerung der Thrombinzeit in Anwesenheit eines erfindungsgemäßen Polypeptides angeben.

Tabelle 2

Verlängerung der Thrombinzeit durch erfindungsgemäße Polypeptide	
erfindungsgemäßes Polypeptid	Hemmfaktor <sup>1)</sup>
M51	1,2
M5112	3,0
M36	2,8
M43	1,2

<sup>1)</sup> bezogen auf die Wirkung von 5 µg Protein

Hemmfaktor = Quotient aus der Thrombinzeit in Anwesenheit eines Inhibitors und aus der Thrombinzeit in Abwesenheit eines Inhibitors

## SEQUENZPROTOKOLL

5

## (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

## (i) ANMELDER:

10

- (A) NAME: Gruenenthal GmbH
- (B) STRASSE: Zieglerstrasse 6
- (C) ORT: Aachen
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 52078
- (G) TELEFON: 0241/5692599
- (H) TELEFAX: 0241/5692544

15

- (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Proteine mit fibrinolytischen und gerinnungshemmenden Eigenschaften

- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 44

20

## (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

25

- (v) DATEN DER JETZIGER ANMELDUNG:  
ANMELDENUMMER:

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

30

- (A) LÄNGE: 21 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

35

- (v) ART DES FRAGMENTS: C-Terminus

## (ix) MERKMAL:

40

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site
- (B) LÄGE: <1..21
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Xaa"  
/label= Xaa  
/note= "Pos 1: Xaa = Pro, Val  
Pos 4: Xaa = Leu, Peptidbindung  
Pos 21: Xaa = Gln, Hydroxylgruppe."

45

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Xaa Arg Pro Xaa Gly Gly Gly Gly Asn Gly Asp Phe Glu Glu Ile Pro  
 1                      5                      10                      15

Glu Glu Tyr Leu Xaa  
 20

50

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

55

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 24 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang  
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: C-Terminus

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site  
 (B) LAGE:1..2  
 (D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "Xaa"  
 /label= Xaa  
 /note= "Pos 1: Xaa = Pro, Val"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Xaa Arg Pro Phe Leu Leu Arg Asn Pro Asn Asp Lys Tyr Glu Pro Phe  
 1 5 10 15  
 Trp Glu Asp Glu Glu Lys Asn Glu  
 20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 17 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (C) STRANGFORM:  
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: C-Terminus

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site  
 (B) LAGE:1..2  
 (D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "Xaa"  
 /label= Xaa  
 /note= "Pos 1: Xaa = Pro, Val"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

Xaa Arg Pro Ser Ser Glu Phe Glu Glu Phe Glu Ile Asp Glu Glu Glu  
 1 5 10 15  
 Lys

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 66 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (C) STRANGFORM:  
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: C-Terminus

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:1..21

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "Xaa"

/label= Xaa

/note= "Pos 1: Xaa = Met, Ile, Peptidbindung"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Xaa Ile Thr Tyr Thr Asp Cys Thr Glu Ser Gly Gln Asn Leu Cys Leu  
1 5 10 15

Cys Glu Gly Ser Asn Val Cys Gly Lys Gly Asn Lys Cys Ile Leu Gly  
20 25 30

Ser Asp Gly Lys Gly Asn Gln Cys Val Thr Gly Glu Gly Thr Pro Lys  
35 40 45

Pro Glu Ser His Asn Asp Gly Asp Phe Glu Glu Ile Pro Glu Glu Tyr  
50 55 60

Leu Gln  
65

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 32 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM:

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: C-Terminus

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site

(B) LAGE:1..2

(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "Xaa"

/label= Xaa

/note= "Pos 1: Xaa = Met, Peptidbindung"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

Xaa Ser Asn Glu Leu Asp Pro Arg Pro Phe Leu Leu Arg Asn Pro Asn  
1 5 10 15

Asp Lys Tyr Glu Pro Phe Trp Glu Asp Glu Glu Lys Gly Pro His Met  
20 25 30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
 (A) LÄNGE: 22 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (C) STRANGFORM:  
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: C-Terminus

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site  
 (B) LAGE:1..5  
 (D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "Xaa"  
 /label= Xaa  
 /note= "Pos 1: Xaa = Pro, Val  
 Pos 4: Xaa = Leu, Peptidbindung"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Xaa Arg Pro Xaa Gly Gly Gly Gly Pro Ser Asp Phe Glu Glu Phe Ser  
 1 5 10 15

Leu Asp Asp Ile Glu Gln  
 20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
 (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (C) STRANGFORM:  
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: C-Terminus

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site  
 (B) LAGE:2..5  
 (D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "Xaa"  
 /label= Xaa  
 /note= "Pos 2: Xaa = Pro, Leu  
 Pos 3: Xaa = Gly, Val, Pro  
 Pos 4: Xaa = Lys, Val, Arg, Gly, Glu  
 Pos 5: Xaa = Ala, Val, Gly, Leu, Ile "

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site  
 (B) LAGE:6..8  
 (D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "Xaa"  
 /label= Xaa  
 /note= "Pos 6: Xaa = Gly, Phe, Trp, Tyr, Val  
 Pos 7: Xaa = Gly, Pro, Peptidbindung  
 Pos 8: Xaa = Ile, Peptidbindung"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:



Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: C-Terminus

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site
- (B) LÄNGE: 3..6
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Xaa"  
/label= Xaa  
/note= "Pos 3: Xaa = Pro, Leu  
Pos 4: Xaa = Gly, Val, Pro  
Pos 5: Xaa = Lys, Val, Arg, Gly, Glu  
Pos 6: Xaa = Ala, Val, Gly, Leu, Ile "

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site
- (B) LÄNGE: 7..9
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Xaa"  
/label= Xaa  
/note= "Pos 7: Xaa = Gly, Phe, Trp, Tyr, Val  
Pos 8: Xaa = Gly, Pro, Peptidbindung  
Pos 9: Xaa = Ile, Peptidbindung"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Ile Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 63 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetische DNA;  
Nukleotidsequenz fuer Oligo 0105"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

TATGAGCAAA ACTTGCTACG AAGGTAACGG TCACTTCTAC CGTGGTAAGG CTTCTACCGA 60  
5 CAC 63

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
10 (A) LÄNGE: 65 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure  
15 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetische DNA;  
Nukleotidsequenz fuer Oligo 0106"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

20

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

25 CATGGTGTGCG GTAGAAGCCT TACCACGGTA GAAGTGACCG TTACCTTCGT AGCAAGTTTT 60  
GCTCA 65

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
30 (A) LÄNGE: 83 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure  
35 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetische DNA;  
Nukleotidsequenz fuer Oligo 0220"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

40

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

45 CGGTTAAGGC TTTCCCGAGG CCTGGTGGTG GTGGTAACGG TGA CTTCGAA GAAATCCCGG 60  
AAGAGTACCT GTGATAGGAT CAA 83

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

50 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 91 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
55 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure  
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetische DNA;  
 Nukleotidsequenz fuer Oligo 0221"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

CTAGTTGATC CTATCACAGG TACTCTTCCG GGATTTCTTC GAAGTCACCG TTACCACCAC 60

CACCAGGCCT CGGGAAGCC TTAACCGGC T 91

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 58 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure  
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetische DNA;  
 Nukleotidsequenz fuer Oligo 0265"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

CACCCGGCGG AGACGGCGG CTCAGAGCCA GACCGTTTTC TTCTTTGGTG TGAGAACG 58

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure  
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetische DNA;  
 Nukleotidsequenz fuer Oligo 027-1"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

TATGAGTAGT CCACCAGAAG AGCT

24

5 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 23 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

10 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetische DNA;  
Nukleotidsequenz fuer Oligo 027-2"

15 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

20

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

GAGCTCTTCT GGTGGACTAC TCA

23

25 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 58 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

30 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetische DNA;  
Nukleotidsequenz fuer Oligo 0281"

35 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

40

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

CGTCCGGGTG GTGGTGGTAA CGGTGACTTC GAAGAAATCC CGGAAGAATA CCTGTAAG

58

45 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 70 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

50 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetische DNA;  
Nukleotidsequenz fuer Oligo 0282"

55 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

5

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

GATCCGTTCT CACACCAAAG AAGAAAACGG TCTGGCTCTG AGCCCGCCGT CTCCGCCGGG 60  
TGGTTTCCCG 70

10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

15

- (A) LÄNGE: 70 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

20

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetische DNA;  
Nukleotidsequenz fuer Oligo 0283"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

25

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

CTAGCTTACA GGTATTCTTC CGGGATTCTT TCGAAGTCAC CGTTACCACC ACCACCCGGA 60  
CGCGGGAAAC 70

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

35

- (A) LÄNGE: 57 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

40

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetische DNA;  
Nukleotidsequenz fuer Oligo 0306"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

45

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

ACGTAACCCG AATGACAAAT ACGAACC GTT CTGGGAAGAT GAAGAGAAAG GGCCCCA 57

50

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

55

5 (A) LÄNGE: 55 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure  
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetische DNA;  
10 Nukleotidsequenz fuer Oligo 0307"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

15 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

CTAGATAAGG AGGAAATAAT ATGAGCAATG AACTTGACCC GCGTCCGTTT CTGCT 55

20 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 21:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 65 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
25 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure  
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetische DNA,  
Nukleotidsequenz fuer Oligo 0308"

30 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

35 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:

CATTCGGGTT ACGTAGCAGG AACGGACGCG GGTCAAGTTC ATTGCTCATA TTATTCCTC 60

40 CTTAT 65

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 22:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 45 Basenpaare  
45 (B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure  
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetische DNA;  
50 Nukleotidsequenz fuer Oligo 0309"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

55

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:

TATGGGGCCC TTTCTCTTCA TCTTCCCAGA ACGGTTTCGTA TTTGT

45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 23:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 30 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetische DNA;  
Nukleotidsequenz fuer Oligo 0329"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 23:

AAGAAATCCC GGAAGAATAC CTGCAATAAG

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 24:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 54 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetische DNA;  
Nukleotidsequenz fuer Oligo 0330"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 24:

CGGTTAAGGC TTGGGGACCG CGGCCGCTGG GTGGTGGTGG TAACGGTGAC TTCG

54

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 25:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 42 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetische DNA;

Nukleotidsequenz fuer Oligo 0331"

5 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

10 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 25:

ACCACCACCC AGCGGCCGCG GTCCCAAGC CTTAACCGG CT

42

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 26:

15 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 50 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

20 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetische DNA;  
Nukleotidsequenz fuer Oligo 0332"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

25 (iv) ANTISENSE: NEIN

30 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 26:

CTAGCTTATT GCAGGTATTC TTCCGGGATT TCTTCGAAGT CACCGTTACC

50

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 27:

35 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 18 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

40 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetische DNA;  
Nukleotidsequenz fuer Oligo 0347"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

45 (iv) ANTISENSE: NEIN

50 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 27:

CGGTTGTTGC TTTCCCGC

18

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 28:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

55



(A) LÄNGE: 26 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure  
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetische DNA;  
Nukleotidsequenz fuer Oligo 0348"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 28:

GGCCGCGGGA AAGCAACAAC CGGGCT

26

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 29:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 61 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure  
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetische DNA;  
Nukleotidsequenz fuer Oligo 0572"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 29:

CATGGTGTCTG GTAGAAGCCT TACCACGGTA GAAGTGGCCG TTACCTTCGT AGCAAGTTTT

60

A

61

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 30:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 57 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure  
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetische DNA;  
Nukleotidsequenz fuer Oligo 0573"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 30:

5 GAGATCTGCA GGTATTCTTC CGGGATTCTT TCGAAGTCAC CGTCGTTGTG AGATTCC

57

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 31:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- 10 (A) LÄNGE: 48 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- 15 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetische DNA;  
Nukleotidsequenz für Oligo 0574"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

20

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 31:

25 GGTTTCGGAG TACCTTCACC AGTAACGACC TGTTACCTT TACCGTCG

48

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 32:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- 30 (A) LÄNGE: 69 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- 35 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetische DNA;  
Nukleotidsequenz fuer Oligo 0575"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

40

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 32:

45 GATCCGACGG TAAAGGTAAC CAGTGCCTTA CTGGTGAAGG TACTCCGAAA CCGGAATCTC

60

ACAACGACG

69

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 33:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- 50 (A) LÄNGE: 34 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

55

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure  
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetische DNA;  
Nukleotidsequenz fuer Oligo 0576"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 33:

GCCACTTCTA CCGTGGTAAG GCTTCTACCG ACAC

34

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 34:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 63 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure  
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetische DNA;  
Nukleotidsequenz fuer Oligo 0577"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 34:

GTGACTTCGA AGAAATCCCG GAAGAATACC TGCAGATCTC TAAAACTTGC TACGAAGGTA

60

ACG

63

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 35:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 68 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure  
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetische DNA;  
Nukleotidsequenz fuer Oligo 0583"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 35:

GCAAACGTGA GAACCTTCGC ACAGGCACAG GTTCTGACCA GATTCAGTGC AGTCAGTGTA

60

CGTAATCA

68

5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 36:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 29 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

10

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetische DNA;  
Nukleotidsequenz fuer Oligo 0584"

15

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

20

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 36:

GATCCCAGGA TGCATTTGTT ACCTTTACC

29

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 37:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 43 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

30

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetische DNA;  
Nukleotidsequenz fuer Oligo 0585"

35

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

40

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 37:

GAAGGTCTA ACGTTTGCGG TAAAGGTAAC AAATGCATCC TGG

43

45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 38:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 52 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

50

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetische DNA;  
Nukleotidsequenz fuer Oligo 0586"

55

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

5

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 38:

TATGATTACG TACTACTGACT GCACTGAATC TGGTCAGAAC CTGTGCCTGT GC

52

10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 39:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 63 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

15

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetische DNA;  
Nukleotidsequenz fuer Oligo 0616"

20

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

25

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 39:

CTAGCTTATT GTTCAATGTC GTCCAGAGAG AATTCTTCGA AGTCGCTCGG ACCACCACCA

60

30

CCC

63

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 40:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 63 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

35

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Synthetische DNA,  
Nukleotidsequenz fuer Oligo 0617"

40

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

45

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 40:

GGCCGGGTGG TGGTGGTCCG AGCGACTTCG AAGAATTCTC TCTGGACGAC ATTGAACAAT

60

50

AAG

63

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 41:

55

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
 (A) LÄNGE: 393 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (C) STRANGFORM:  
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 41:

Met	Ser	Lys	Thr	Cys	Tyr	Glu	Gly	Asn	Gly	His	Phe	Tyr	Arg	Gly	Lys	1	5	10	15
Ala	Ser	Thr	Asp	Thr	Met	Gly	Arg	Pro	Cys	Leu	Pro	Trp	Asn	Ser	Ala	20	25	30	
Thr	Val	Leu	Gln	Gln	Thr	Tyr	His	Ala	His	Arg	Ser	Asp	Ala	Leu	Gln	35	40	45	
Leu	Gly	Leu	Gly	Lys	His	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Asn	Arg	Arg	50	55	60	
Arg	Pro	Trp	Cys	Tyr	Val	Gln	Val	Gly	Leu	Lys	Pro	Leu	Val	Gln	Glu	65	70	75	80
Cys	Met	Val	His	Asp	Cys	Ala	Asp	Gly	Lys	Lys	Pro	Ser	Ser	Pro	Pro	85	90	95	
Glu	Glu	Leu	Lys	Phe	Gln	Cys	Gly	Gln	Lys	Thr	Leu	Arg	Pro	Arg	Phe	100	105	110	
Lys	Ile	Ile	Gly	Gly	Glu	Phe	Thr	Thr	Ile	Glu	Asn	Gln	Pro	Trp	Phe	115	120	125	
Ala	Ala	Ile	Tyr	Arg	Arg	His	Arg	Gly	Gly	Ser	Val	Thr	Tyr	Val	Cys	130	135	140	
Gly	Gly	Ser	Leu	Ile	Ser	Pro	Cys	Trp	Val	Ile	Ser	Ala	Thr	His	Cys	145	150	155	160
Phe	Ile	Asp	Tyr	Pro	Lys	Lys	Glu	Asp	Tyr	Ile	Val	Tyr	Leu	Gly	Arg	165	170	175	
Ser	Arg	Leu	Asn	Ser	Asn	Thr	Gln	Gly	Glu	Met	Lys	Phe	Glu	Val	Glu	180	185	190	
Asn	Leu	Ile	Leu	His	Lys	Asp	Tyr	Ser	Ala	Asp	Thr	Leu	Ala	His	His	195	200	205	
Asn	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Lys	Ile	Arg	Ser	Lys	Glu	Gly	Arg	Cys	Ala	210	215	220	
Gln	Pro	Ser	Arg	Thr	Ile	Gln	Thr	Ile	Cys	Leu	Pro	Ser	Met	Tyr	Asn	225	230	235	240
Asp	Pro	Gln	Phe	Gly	Thr	Ser	Cys	Glu	Ile	Thr	Gly	Phe	Gly	Lys	Glu	245	250	255	
Asn	Ser	Thr	Asp	Tyr	Leu	Tyr	Pro	Glu	Gln	Leu	Lys	Met	Thr	Val	Val				

20

25

30

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

35

50

Tyr Leu Gly Arg Ser Arg Leu Asn Ser Asn Thr Gln Gly Glu Met Lys  
 115 120 125  
 5 Phe Glu Val Glu Asn Leu Ile Leu His Lys Asp Tyr Ser Ala Asp Thr  
 130 135 140  
 Leu Ala His His Asn Asp Ile Ala Leu Leu Lys Ile Arg Ser Lys Glu  
 145 150 155 160  
 10 Gly Arg Cys Ala Gln Pro Ser Arg Thr Ile Gln Thr Ile Cys Leu Pro  
 165 170 175  
 Ser Met Tyr Asn Asp Pro Gln Phe Gly Thr Ser Cys Glu Ile Thr Gly  
 180 185 190  
 15 Phe Gly Lys Glu Asn Ser Thr Asp Tyr Leu Tyr Pro Glu Gln Leu Lys  
 195 200 205  
 Met Thr Val Val Lys Leu Ile Ser His Arg Glu Cys Gln Gln Pro His  
 210 215 220  
 20 Tyr Tyr Gly Ser Glu Val Thr Thr Lys Met Leu Cys Ala Ala Asp Pro  
 225 230 235 240  
 Gln Trp Lys Thr Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val  
 245 250 255  
 25 Cys Ser Leu Gln Gly Arg Met Thr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly  
 260 265 270  
 Arg Gly Cys Ala Leu Lys Asp Lys Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser  
 275 280 285  
 30 His Phe Leu Pro Trp Ile Arg Ser His Thr Lys Glu Glu Asn Gly Leu  
 290 295 300  
 Ala Leu  
 305

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 43:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 331 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (C) STRANGFORM:  
 (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 43:

Met Ser Asn Glu Leu Asp Pro Arg Pro Phe Leu Leu Arg Asn Pro Asn  
 1 5 10 15  
 50 Asp Lys Tyr Glu Pro Phe Trp Glu Asp Glu Glu Lys Gly Pro His Met  
 20 25 30  
 Ser Ser Pro Pro Glu Glu Leu Lys Phe Gln Cys Gly Gln Lys Thr Leu  
 35 40 45



Arg Pro Arg Phe Lys Ile Ile Gly Gly Glu Phe Thr Thr Ile Glu Asn  
 50 55 60  
 5 Gln Pro Trp Phe Ala Ala Ile Tyr Arg Arg His Arg Gly Gly Ser Val  
 65 70 75 80  
 Thr Tyr Val Cys Gly Gly Ser Leu Ile Ser Pro Cys Trp Val Ile Ser  
 85 90 95  
 10 Ala Thr His Cys Phe Ile Asp Tyr Pro Lys Lys Glu Asp Tyr Ile Val  
 100 105 110  
 Tyr Leu Gly Arg Ser Arg Leu Asn Ser Asn Thr Gln Gly Glu Met Lys  
 115 120 125  
 15 Phe Glu Val Glu Asn Leu Ile Leu His Lys Asp Tyr Ser Ala Asp Thr  
 130 135 140  
 Leu Ala His His Asn Asp Ile Ala Leu Leu Lys Ile Arg Ser Lys Glu  
 145 150 155 160  
 20 Gly Arg Cys Ala Gln Pro Ser Arg Thr Ile Gln Thr Ile Cys Leu Pro  
 165 170 175  
 Ser Met Tyr Asn Asp Pro Gln Phe Gly Thr Ser Cys Glu Ile Thr Gly  
 180 185 190  
 25 Phe Gly Lys Glu Asn Ser Thr Asp Tyr Leu Tyr Pro Glu Gln Leu Lys  
 195 200 205  
 Met Thr Val Val Lys Leu Ile Ser His Arg Glu Cys Gln Gln Pro His  
 210 215 220  
 30 Tyr Tyr Gly Ser Glu Val Thr Thr Lys Met Leu Cys Ala Ala Asp Pro  
 225 230 235 240  
 Gln Trp Lys Thr Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val  
 245 250 255  
 35 Cys Ser Leu Gln Gly Arg Met Thr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly  
 260 265 270  
 Arg Gly Cys Ala Leu Lys Asp Lys Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser  
 275 280 285  
 40 His Phe Leu Pro Trp Ile Arg Ser His Thr Lys Glu Glu Asn Gly Leu  
 290 295 300  
 Ala Leu Ser Pro Val Lys Ala Phe Pro Arg Pro Gly Gly Gly Gly Asn  
 305 310 315 320  
 45 Gly Asp Phe Glu Glu Ile Pro Glu Glu Tyr Leu  
 325 330

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 44:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
 (A) LÄNGE: 432 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (C) STRANGFORM:  
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

5

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 44:

10

Met Ile Thr Tyr Thr Asp Cys Thr Glu Ser Gly Gln Asn Leu Cys Leu  
1 5 10 15

Cys Glu Gly Ser Thr Val Cys Gly Lys Gly Asn Lys Cys Ile Leu Gly  
20 25 30

15

Ser Asn Gly Lys Gly Asn Gln Cys Val Thr Gly Glu Gly Thr Pro Lys  
35 40 45

Pro Glu Ser His Asn Asn Gly Asp Phe Glu Glu Ile Pro Glu Glu Tyr  
50 55 60

20

Leu Gln Ile Ser Lys Thr Cys Tyr Glu Gly Asn Gly His Phe Tyr Arg  
65 70 75 80

Gly Lys Ala Ser Thr Asp Thr Met Gly Arg Pro Cys Leu Pro Trp Asn  
85 90 95

25

Ser Ala Thr Val Leu Gln Gln Thr Tyr His Ala His Arg Ser Asp Ala  
100 105 110

Leu Gln Leu Gly Leu Gly Lys His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn  
115 120 125

30

Arg Arg Arg Pro Trp Cys Tyr Val Gln Val Gly Leu Lys Pro Leu Val  
130 135 140

Gln Glu Cys Met Val His Asp Cys Ala Asp Gly Lys Lys Pro Ser Ser  
145 150 155 160

35

Pro Pro Glu Glu Leu Lys Phe Gln Cys Gly Gln Lys Thr Leu Arg Pro  
165 170 175

Arg Phe Lys Ile Ile Gly Gly Glu Phe Thr Thr Ile Glu Asn Gln Pro  
180 185 190

40

Trp Phe Ala Ala Ile Tyr Arg Arg His Arg Gly Gly Ser Val Thr Tyr  
195 200 205

Val Cys Gly Gly Ser Leu Ile Ser Pro Cys Trp Val Ile Ser Ala Thr  
210 215 220

45

His Cys Phe Ile Asp Tyr Pro Lys Lys Glu Asp Tyr Ile Val Tyr Leu  
225 230 235 240

Gly Arg Ser Arg Leu Asn Ser Asn Thr Gln Gly Glu Met Lys Phe Glu  
245 250 255

50

Val Glu Asn Leu Ile Leu His Lys Asp Tyr Ser Ala Asp Thr Leu Ala  
260 265 270

His His Asn Asp Ile Ala Leu Leu Lys Ile Arg Ser Lys Glu Gly Arg  
275 280 285

55

Cys Ala Gln Pro Ser Arg Thr Ile Gln Thr Ile Cys Leu Pro Ser Met  
 290 295 300  
 Tyr Asn Asp Pro Gln Phe Gly Thr Ser Cys Glu Ile Thr Gly Phe Gly  
 305 310 315 320  
 Lys Glu Asn Ser Thr Asp Tyr Leu Tyr Pro Glu Gln Leu Lys Met Thr  
 325 330 335  
 Val Val Lys Leu Ile Ser His Arg Glu Cys Gln Gln Pro His Tyr Tyr  
 340 345 350  
 Gly Ser Glu Val Thr Thr Lys Met Leu Cys Ala Ala Asp Pro Gln Trp  
 355 360 365  
 Lys Thr Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Ser  
 370 375 380  
 Leu Gln Gly Arg Met Thr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Arg Gly  
 385 390 395 400  
 Cys Ala Leu Lys Asp Lys Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser His Phe  
 405 410 415  
 Leu Pro Trp Ile Arg Ser His Thr Lys Glu Glu Asn Gly Leu Ala Leu  
 420 425 430

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 45:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 21 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (C) STRANGFORM:  
 (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

## (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site  
 (B) LAGE: 1..21  
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Xaa"  
     /label= Xaa  
     /note= "Pos 1: Xaa = Pro, Val;  
           Pos 4: Xaa = Leu, Peptidbindung  
           Pos 21: Xaa = Gln, Hydroxylgruppe, Peptidbindung"

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 45:

Xaa Arg Pro Xaa Gly Gly Gly Gly Asn Gly Asp Phe Glu Glu Ile Pro  
 1 5 10 15  
 Glu Glu Tyr Leu Xaa  
 20

## Patentansprüche

1. Proteine mit fibrinolytischen und gerinnungshemmenden Eigenschaften, die am N- und/oder C-terminalen Ende der Plasminogen aktivierenden Aminosäuresequenz mit einer Thrombin und/oder Faktor Xa hemmenden Aminosäuresequenz verknüpft sind, wobei solche Proteine ausgeschlossen sind, in denen die Plasminogen aktivierende Aminosäuresequenz <sup>47</sup>Ser bis <sup>411</sup>Leu der unglycosylierten Prourokinase am C-terminalen Ende mit einer Peptidsequenz der Formel

T<sub>1</sub>-Arg-Pro-T<sub>2</sub>-Gly-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-T<sub>3</sub>  
(SEQ ID NO:1)

oder

T<sub>1</sub>-Arg-Pro-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-Pro-Asn-Asp-Lys-Tyr-Glu-Pro-Phe-Trp-Glu-Asp-Glu-Glu-Lys-Asn-Glu  
(SEQ ID NO:2)

oder

T<sub>1</sub>-Arg-Pro-Ser-Ser-Glu-Phe-Glu-Glu-Phe-Glu-Ile-Asp-Glu-Glu-Glu-Lys  
(SEQ ID NO:3)

mit T<sub>1</sub> Pro oder Val, T<sub>2</sub> Leu oder eine direkte Bindung zwischen Pro und Gly und T<sub>3</sub> Gln oder eine Hydroxylgruppe verknüpft ist.

2. Proteine nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Plasminogen aktivierende Aminosäuresequenz die unveränderte Aminosäuresequenz der Prourokinase, mindestens eine durch Deletion, Substitution, Insertion und/oder Addition modifizierte Aminosäuresequenz der Prourokinase, die unveränderte Aminosäuresequenz der Urokinase, mindestens eine durch Deletion, Substitution, Insertion und/oder Addition modifizierte Aminosäuresequenz der Urokinase, die unveränderte Aminosäuresequenz des Gewebeplasminogenaktivators (t-PA), mindestens eine durch Deletion, Substitution, Insertion und/oder Addition modifizierte Aminosäuresequenz von t-PA, die unveränderte Aminosäuresequenz des Fledermaus-Plasminogenaktivators (bat-PA), mindestens eine durch Deletion, Substitution, Insertion und/oder Addition modifizierte Aminosäuresequenz von bat-PA und/oder die Aminosäuresequenz von Streptokinase, Staphylokinase und/oder APSAC enthält.
3. Proteine nach Anspruch 2, durch gekennzeichnet, daß die Plasminogen aktivierende Aminosäuresequenz die unveränderte Aminosäuresequenz von Prourokinase, mindestens eine durch Deletion, Substitution, Insertion und/oder Addition modifizierte Aminosäuresequenz der Prourokinase, die unveränderte Aminosäuresequenz von t-PA und/oder mindestens eine durch Deletion, Substitution, Insertion und/oder Addition modifizierte Aminosäuresequenz von t-PA enthält.
4. Proteine nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Plasminogen aktivierende Aminosäuresequenz aus der unveränderten, aus 411 Aminosäuren bestehenden Sequenz der Prourokinase, aus der Aminosäuresequenz <sup>47</sup>Ser bis <sup>411</sup>Leu der Prourokinase, aus der Aminosäuresequenz <sup>138</sup>Ser bis <sup>411</sup>Leu der Prourokinase, aus der unver-

änderten, aus 527 Aminosäuren bestehenden Sequenz von t-PA, aus der Aminosäuresequenz Ser-<sup>89</sup>Arg bis <sup>527</sup>Pro von t-PA und/oder aus der Aminosäuresequenz <sup>174</sup>Ser bis <sup>527</sup>Pro von t-PA besteht.

5. Proteine nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Thrombin und/oder Faktor Xa hemmende Aminosäuresequenz mindestens eine Aminosäuresequenz mit Hirudin-Eigenschaften, mindestens eine vom humanen Thrombinrezeptor abgeleitete Aminosäuresequenz, mindestens eine Aminosäuresequenz mit Hirullin-Eigenschaften, Antistasin und/oder Tick Antikoagulant Peptide (TAP) enthält.
6. Proteine nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Thrombin und/oder Faktor Xa hemmende Aminosäuresequenz mindestens eine Aminosäuresequenz mit Hirudin-Eigenschaften, mindestens eine vom humanen Thrombinrezeptor abgeleitete Aminosäuresequenz und/oder mindestens eine Aminosäuresequenz mit Hirullin-Eigenschaften enthält.
7. Proteine nach Ansprüchen 5 und/oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Thrombin und/oder Faktor Xa hemmende Aminosäuresequenz die aus 65 Aminosäuren bestehende Sequenz des Hirudins, und/oder mindestens eine Aminosäuresequenz der Formeln

T<sub>1</sub>-Arg-Pro-T<sub>2</sub>-Gly-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-T<sub>3</sub>  
(SEQ ID NO:45)

und/oder

T<sub>4</sub>-Ile-Thr-Tyr-Thr-Asp-Cys-Thr-Glu-Ser-Gly-Gln-Asn-Leu-Cys-Leu-Cys-Glu-Gly-Ser-Asn-Val-Cys-Gly-Lys-Gly-Asn-Lys-Cys-Ile-Leu-Gly-Ser-Asp-Gly-Lys-Gly-Asn-Gln-Cys-Val-Thr-Gly-Glu-Gly-Thr-Pro-Lys-Pro-Glu-Ser-His-Asn-Asp-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln  
(SEQ ID NO:4)

und/oder

T<sub>1</sub>-Arg-Pro-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-Pro-Asn-Asp-Lys-Tyr-Glu-Pro-Phe-Trp-Glu-Asp-Glu-Glu-Lys-Asn-Glu  
(SEQ ID NO:2)

und/oder

5 T<sub>5</sub>-Ser-Asn-Glu-Leu-Asp-Pro-Arg-Pro-Phe-Leu-Leu-Arg-  
 Asn-Pro-Asn-Asp-Lys-Tyr-Glu-Pro-Phe-Trp-Glu-Asp-Glu-  
 Glu-Lys-Gly-Pro-His-Met  
 (SEQ ID NO:5)

10 und/oder

15 T<sub>1</sub>-Arg-Pro-T<sub>2</sub>-Gly-Gly-Gly-Gly-Pro-Ser-Asp-Phe-Glu-Glu-  
 Phe-Ser-Leu-Asp-Asp-Ile-Glu-Gln  
 (SEQ ID NO:6)

20 und/oder

25 T<sub>1</sub>-Arg-Pro-Ser-Ser-Glu-Phe-Glu-Glu-Phe-Glu-Ile-Asp-  
 Glu-Glu-Glu-Lys  
 (SEQ ID NO:3)

30 mit T<sub>1</sub> Pro oder Val, T<sub>2</sub> Leu oder eine direkte Bindung zwischen Pro und Gly, T<sub>3</sub> Gln, eine Hydroxylgruppe oder eine  
 direkte Bindung zur benachbarten Aminosäure, T<sub>4</sub> Met, Ile oder eine direkte Bindung zur benachbarten Aminosäure  
 und T<sub>5</sub> Met oder eine direkte Bindung zur benachbarten Aminosäure  
 enthält.

35 8. Proteine nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Plasminogen akti-  
 vierende Aminosäuresequenz am N- und/oder C-terminalen Ende direkt, über Isoleucin oder über eine Peptidse-  
 quenz der allgemeinen Formeln

Ser-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub> (SEQ ID NO:7)

40 oder

Ile-Ser-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub> (SEQ ID NO:8)

in der X<sub>1</sub> Pro oder Leu, X<sub>2</sub> Gly, Val oder Pro, X<sub>3</sub> Lys, Val, Arg, Gly oder Glu, X<sub>4</sub> Ala, Val, Gly, Leu oder Ile, X<sub>5</sub> Gly,  
 Phe, Trp, Tyr oder Val, X<sub>6</sub> Gly, Pro oder eine direkte Bindung zur benachbarten Aminosäure und X<sub>7</sub> Ile oder eine  
 direkte Bindung zur benachbarten Aminosäure ist,

45 mit der Thrombin und/oder Faktor Xa hemmenden Aminosäuresequenz verknüpft ist.

9. Plasmide zur Gewinnung eines Proteins mit fibrinolytischen Eigenschaften gemäß den Ansprüchen 1 bis 8, dadurch  
 gekennzeichnet, daß das Operon einen regulierbaren Promotor, eine als Ribosomenbindestelle wirksame Shine-  
 Dalgarno-Sequenz, ein Startcodon, ein synthetisches Strukturgen für ein Protein mit fibrinolytischen Eigenschaften  
 50 gemäß den Ansprüchen 1 bis 9 und stromabwärts vom Strukturgen 1 oder 2 Terminatoren aufweist und daß die  
 Plasmide zur Expression des Proteins mit fibrinolytischen Eigenschaften in Stämmen von Escherischia coli geeignet  
 sind.

10. Plasmide nach Anspruch 9, ausgewählt aus der Gruppe pWLT27, pWS1, pSE8 und pHW56.

55

11. Verfahren zur Herstellung von Plasmiden nach einem oder beiden der Ansprüche 9 bis 10, dadurch gekennzeichnet,  
 daß man diese aus den Plasmiden pBlueskript KS II+, pUC8, pSL1190 und pGR201 gemäß Abbildungen 1 bis 17  
 gewinnt.

12. Verwendung eines Plasmids nach einem oder beiden der Ansprüche 9 bis 10 zur Gewinnung eines Proteins mit  
fibrinolytischen Eigenschaften gemäß Ansprüchen 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß man mit einem Plasmid  
einen Escherischia coli-Stamm in an sich bekannter Weise transformiert, die Expression des Strukturgens induziert,  
das gebildete Vorstufenprotein vom Medium und den lysierten Bakterienzellen abtrennt, solubilisiert und anschlie-  
ßend durch Einwirkung eines Redox-Systems zum Protein mit fibrinolytischen Eigenschaften rückfaltet.

13. Thrombolytikum, das als Wirkstoff ein Protein gemäß den Ansprüchen 1 bis 8 enthält.

14. Thrombolytikum nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß es zur Bolusapplikation geeignet ist.

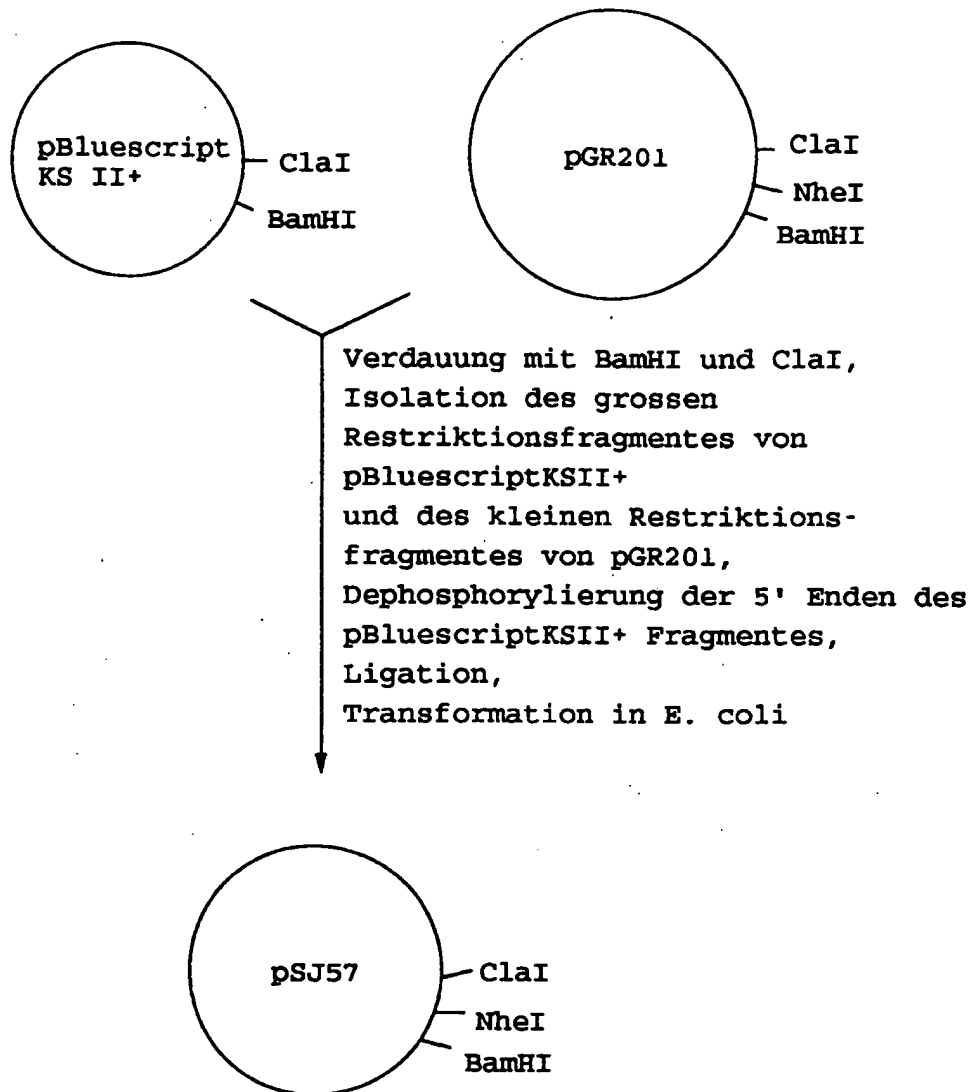


Abbildung 1



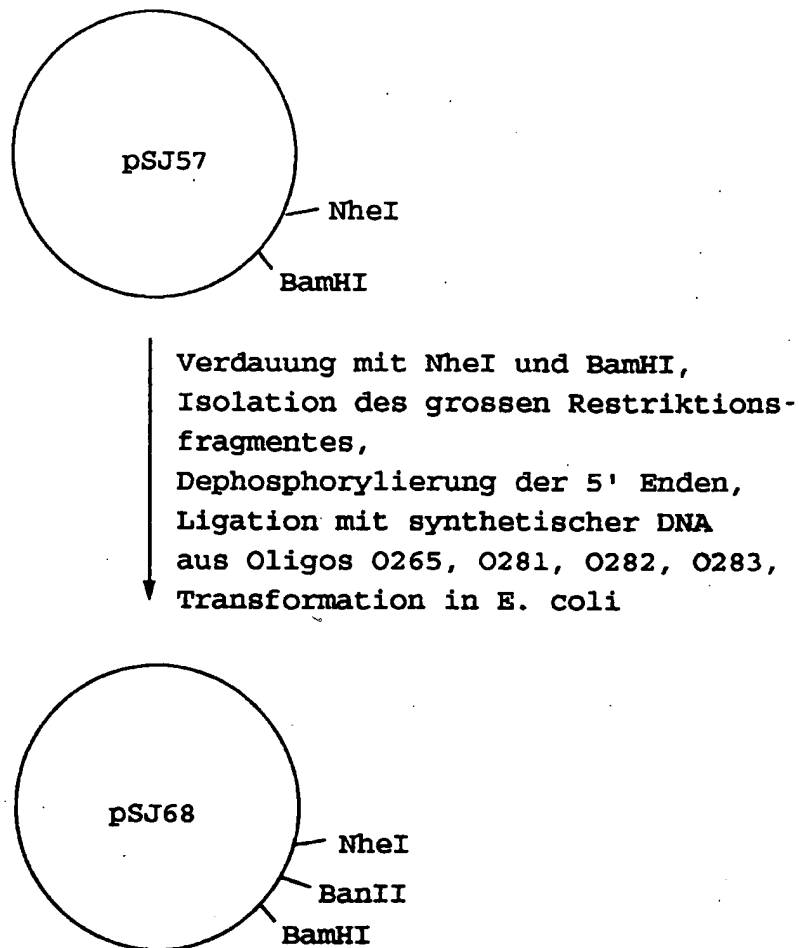


Abbildung 2

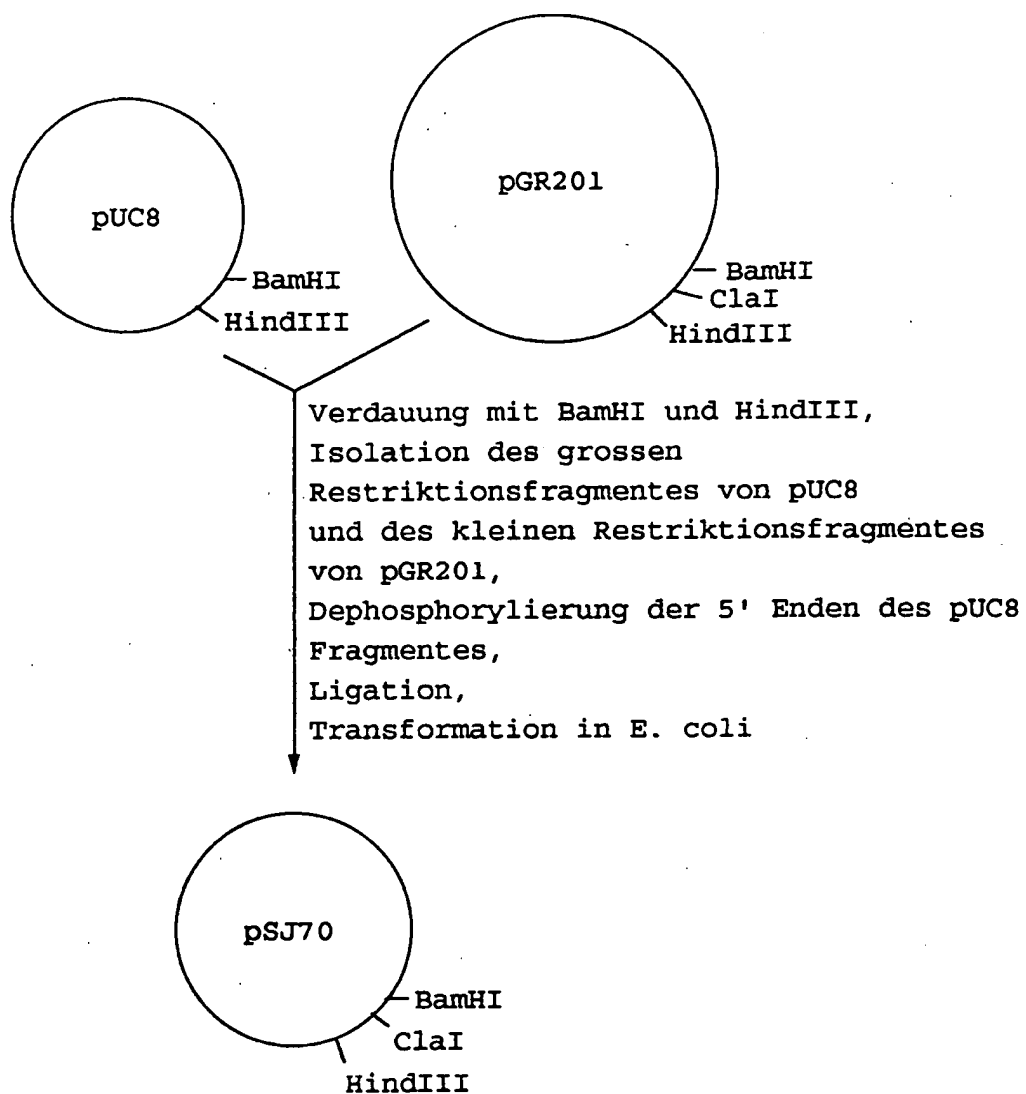


Abbildung 3

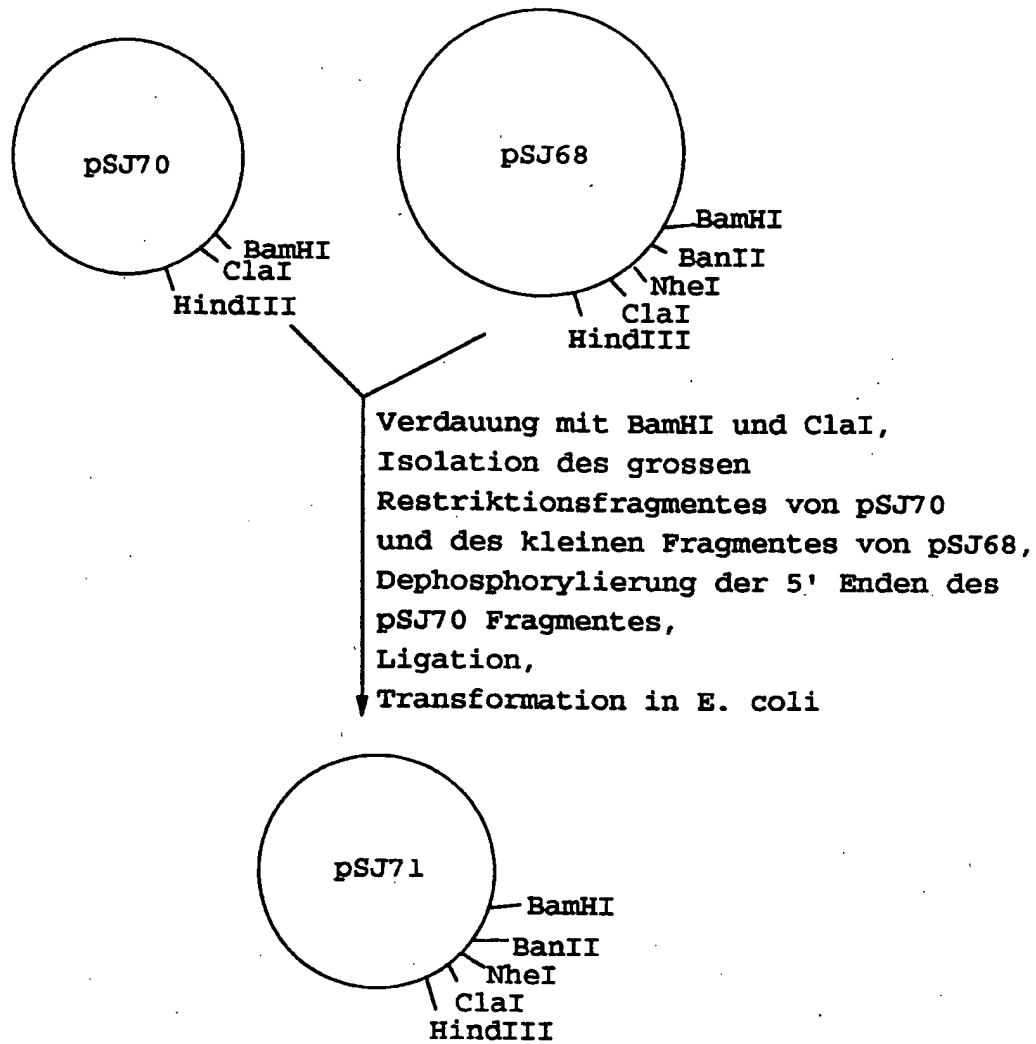


Abbildung 4

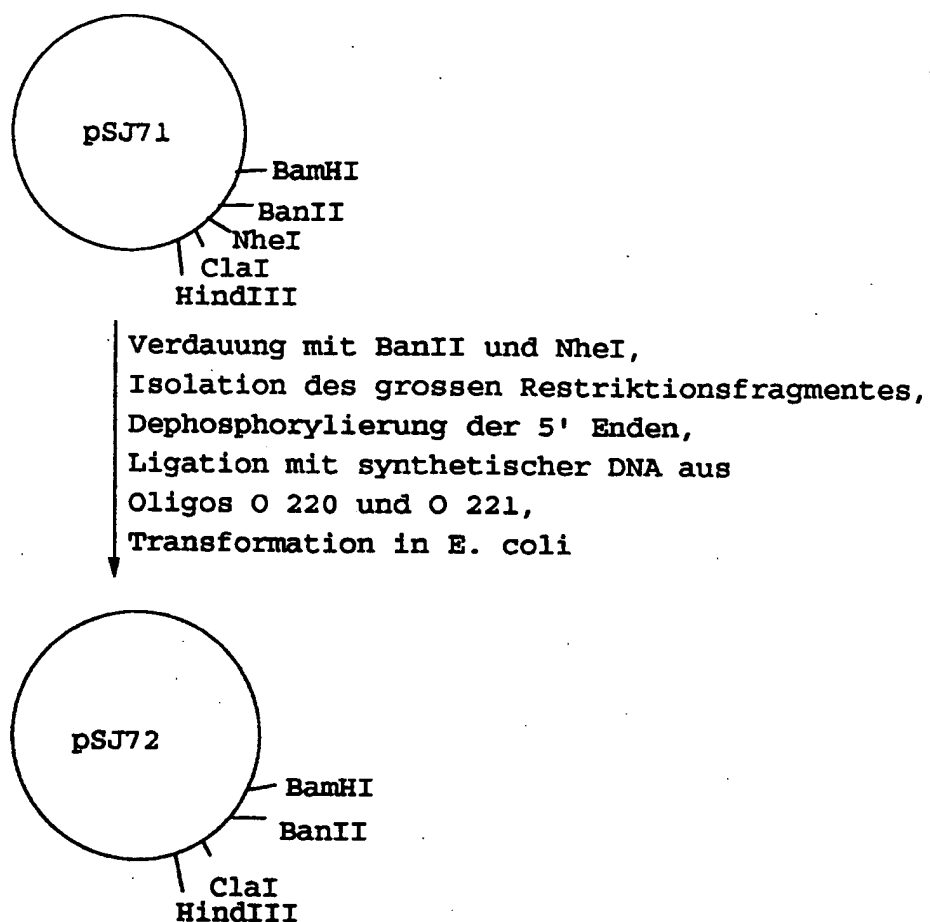


Abbildung 5

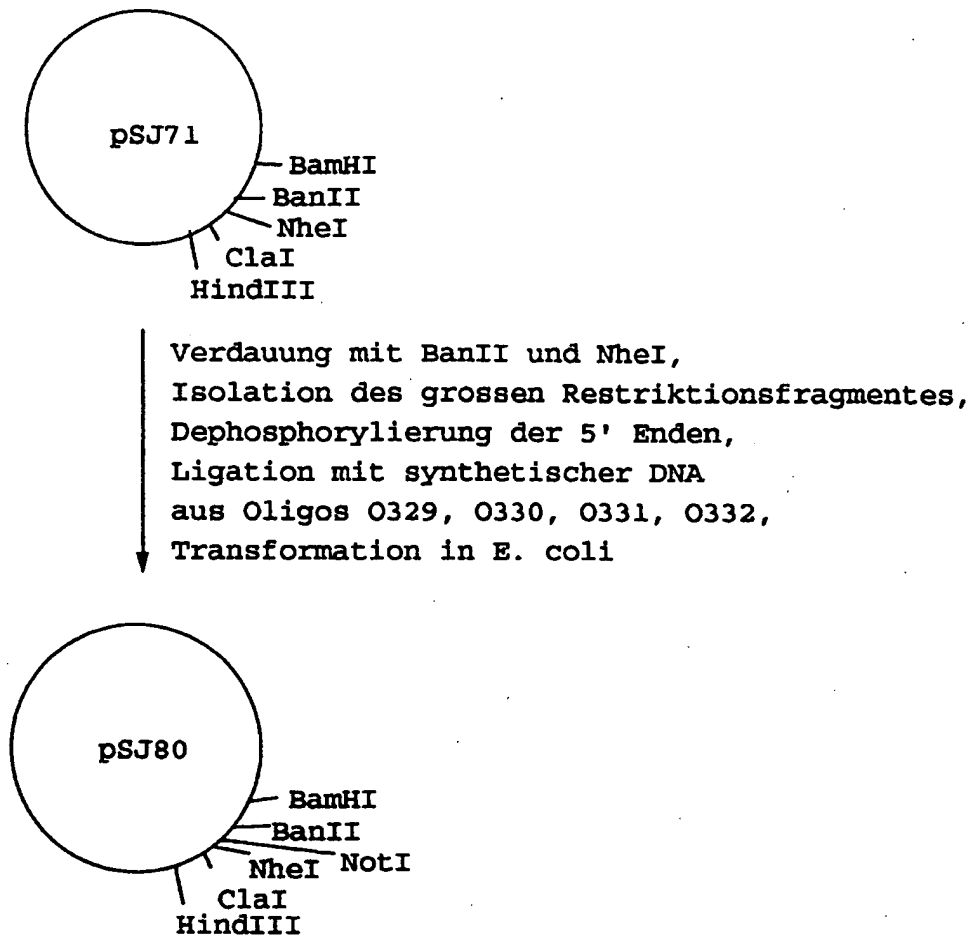
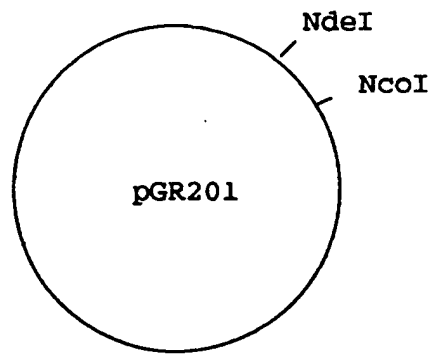


Abbildung 6



Verdauung mit NdeI und NcoI,  
 Isolation des grossen  
 Restriktionsfragmentes,  
 Dephosphorylierung der 5' Enden,  
 Ligation mit synthetischer DNA  
 aus Oligos O105 und O106,  
 Transformation in E. coli

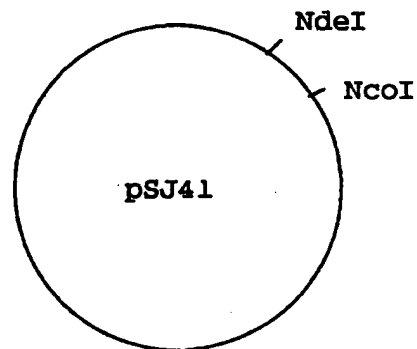


Abbildung 7

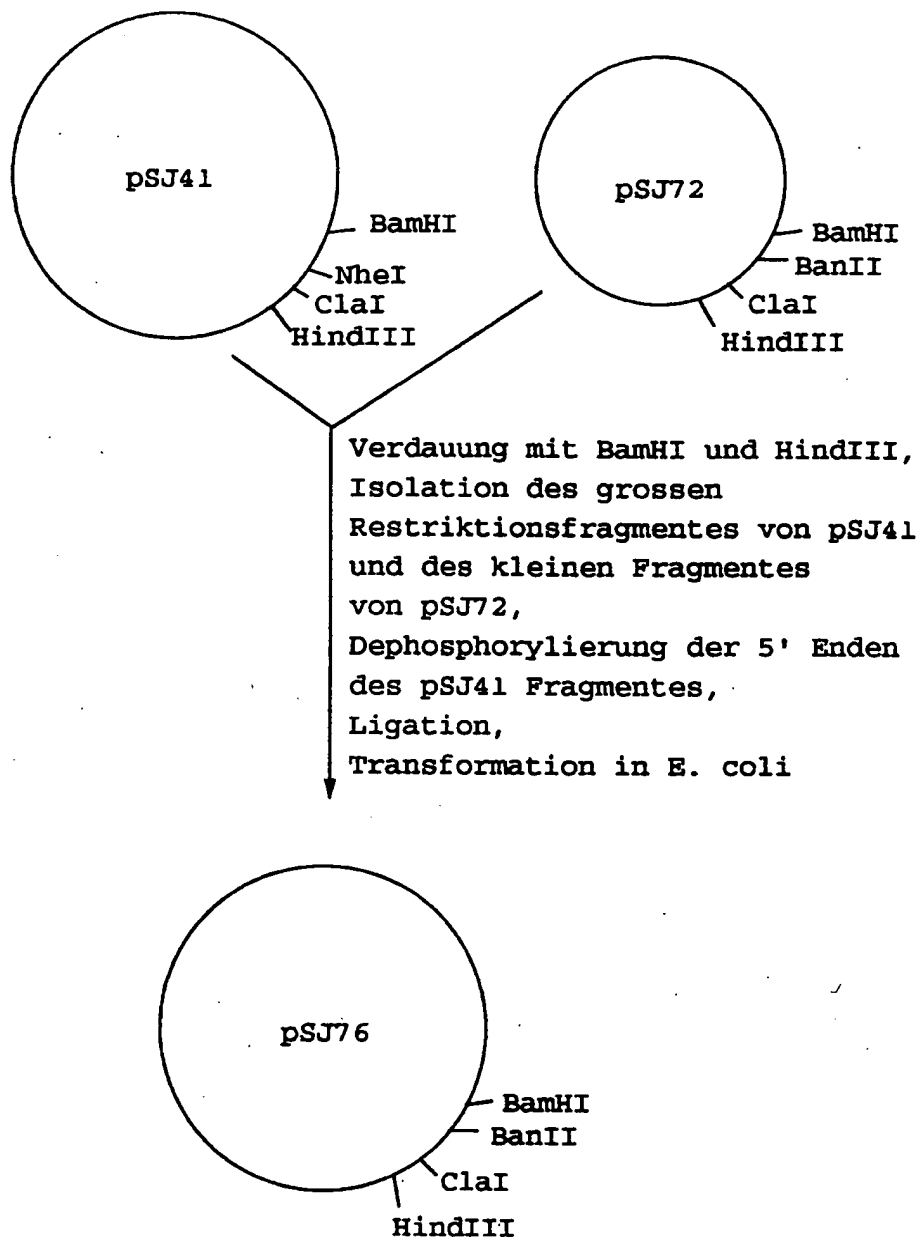


Abbildung 8

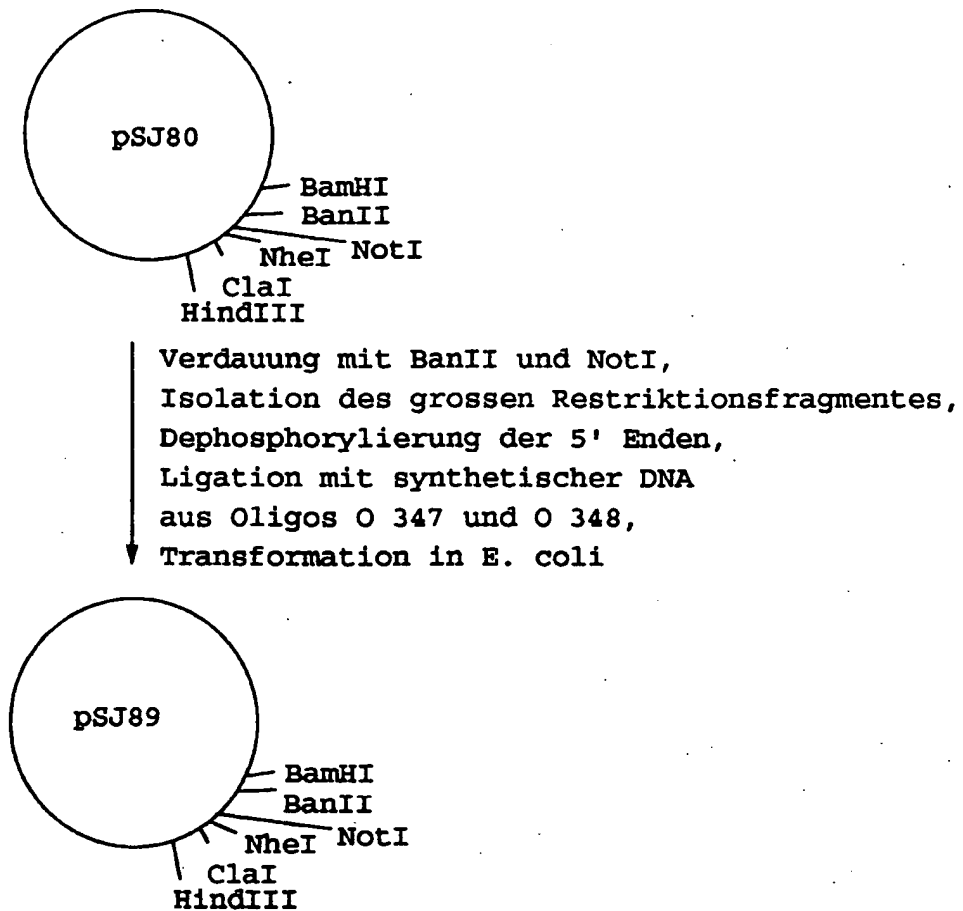


Abbildung 9



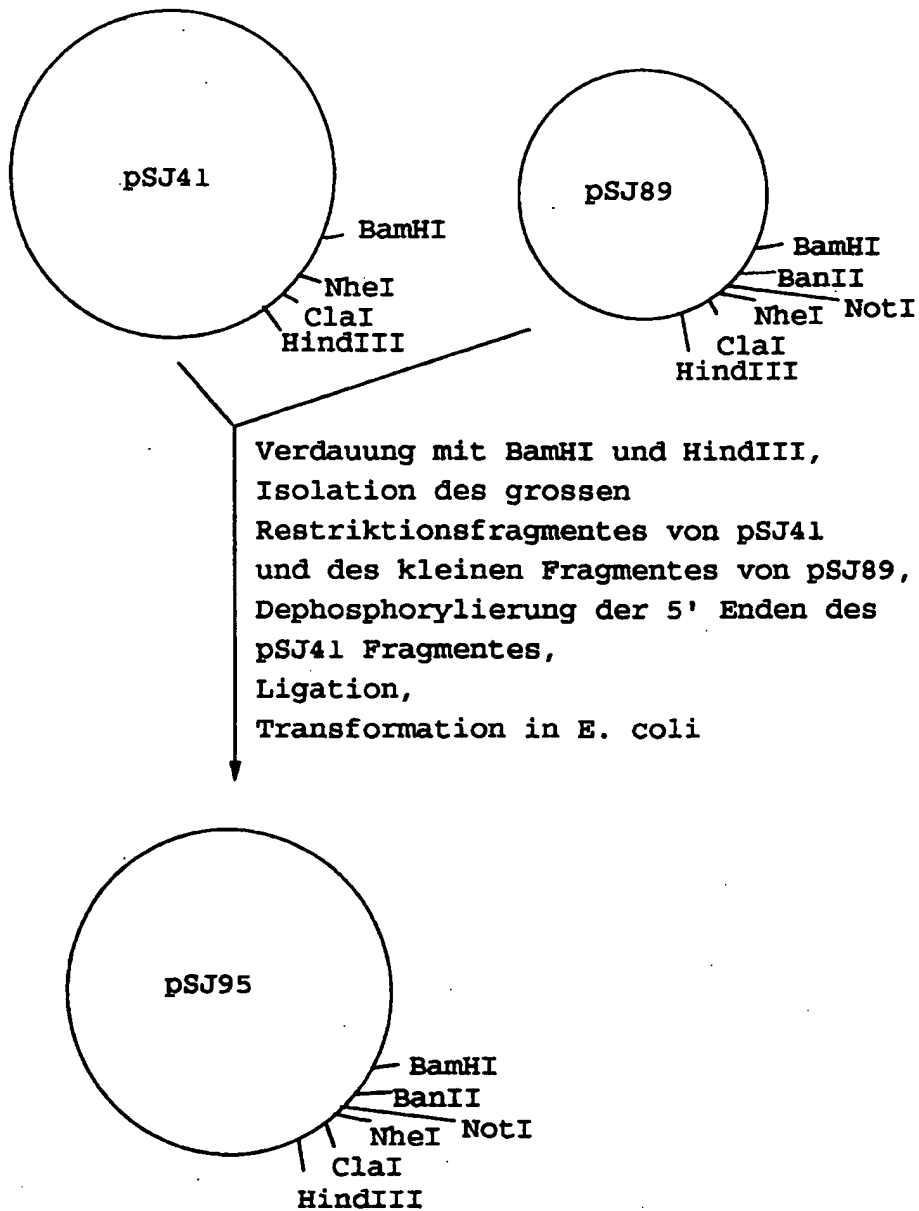


Abbildung 10

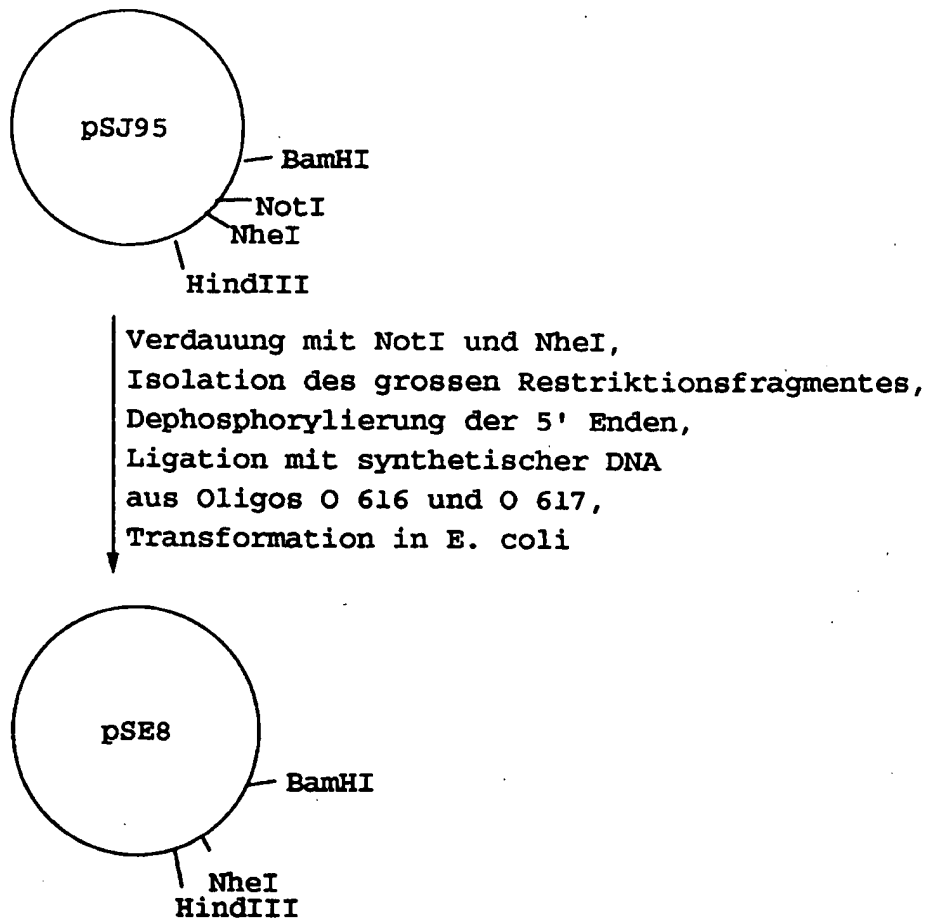
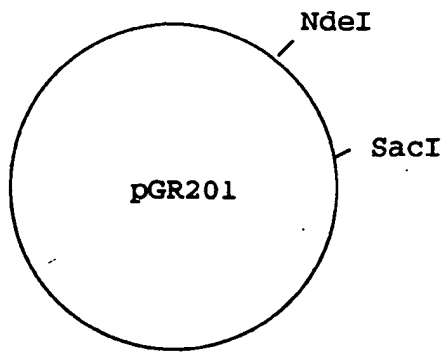


Abbildung 11



Verdauung mit NdeI und SacI,  
 Isolation des grossen Restriktionsfragmentes,  
 Dephosphorylierung der 5' Enden,  
 Ligation mit synthetischer DNA  
 aus Oligos O 27-1 und O 27-2,  
 Transformation in E. coli

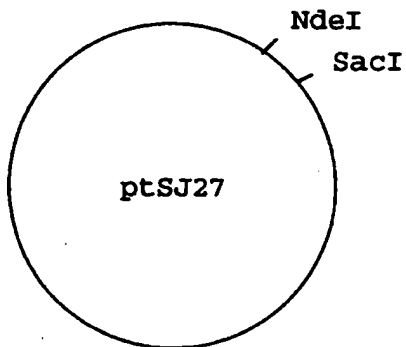


Abbildung 12

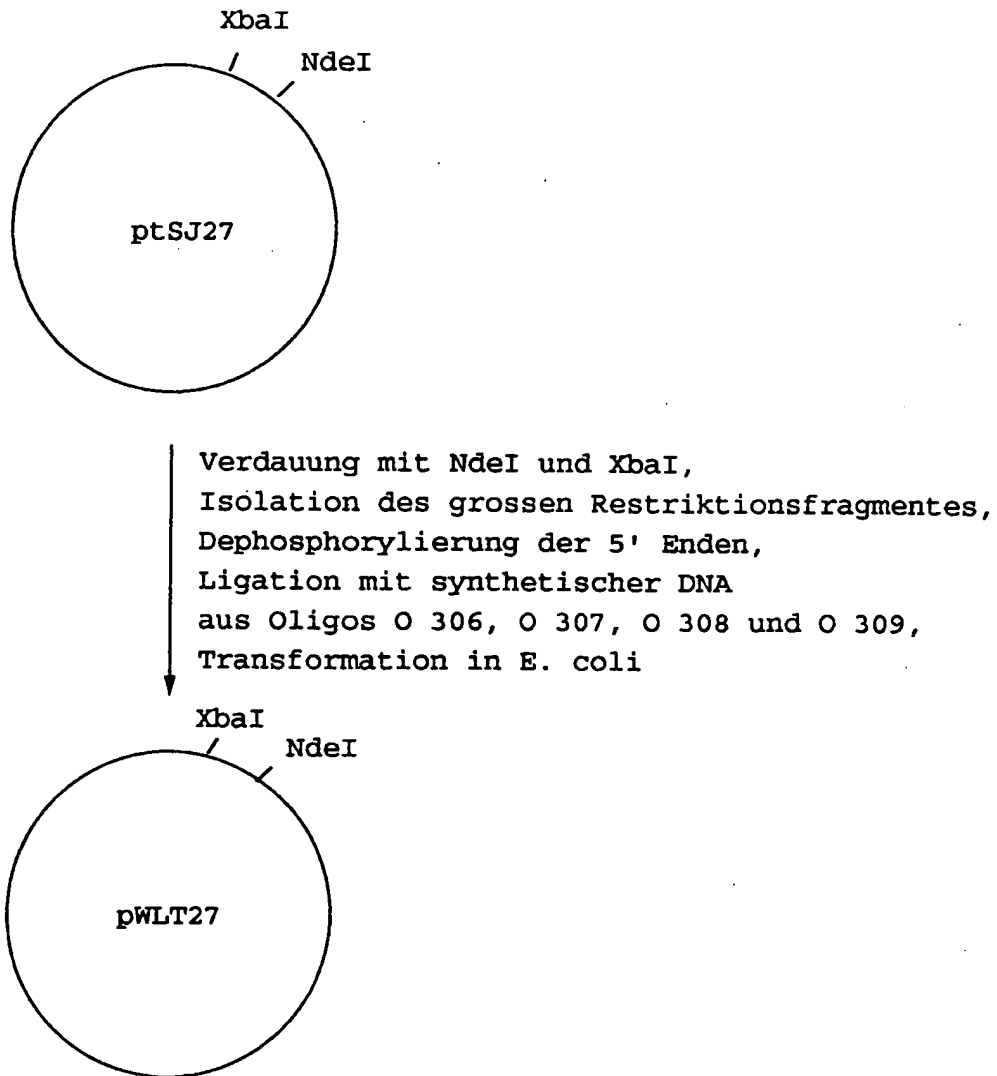


Abbildung 13

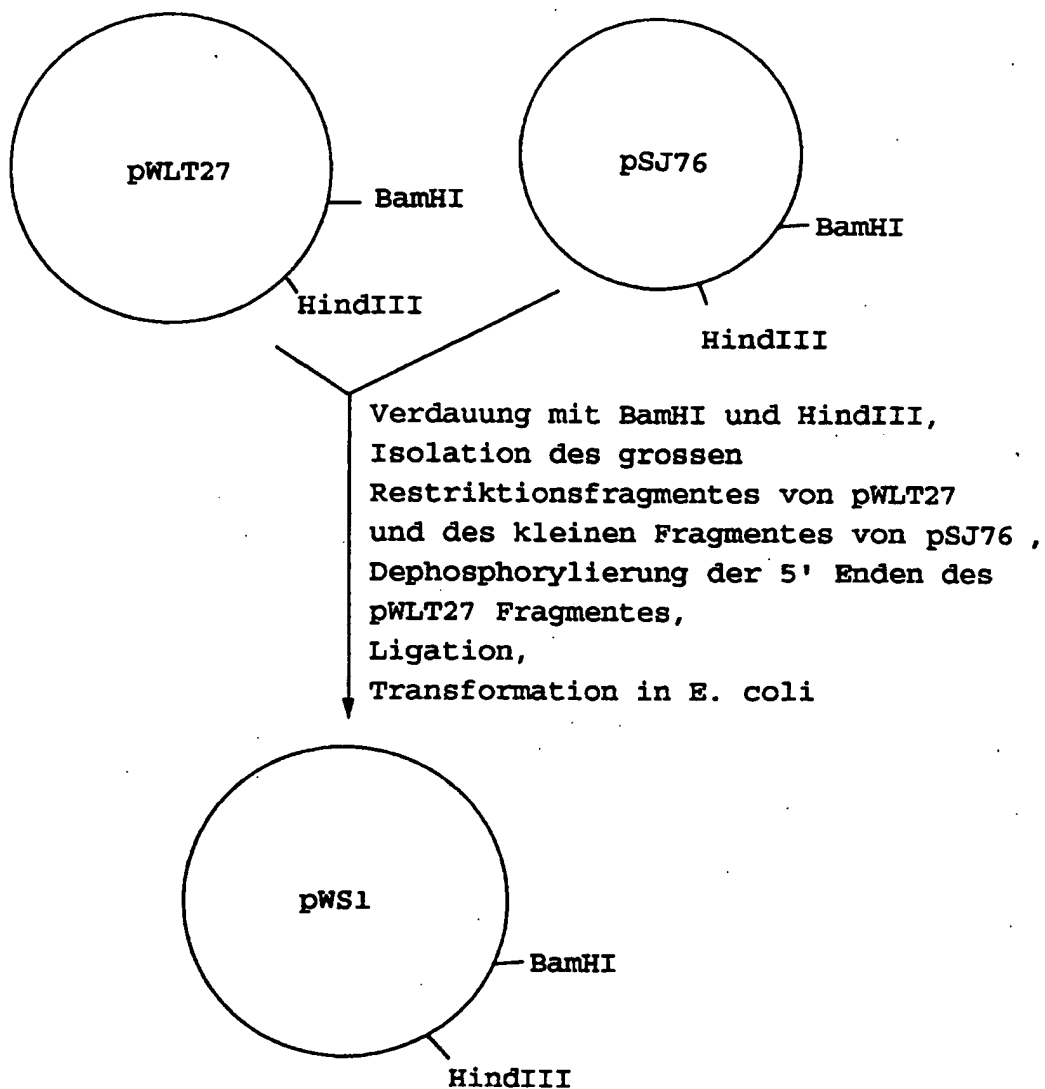
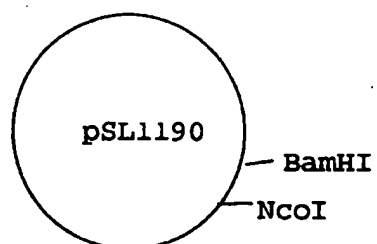


Abbildung 14



Verdauung mit BamHI und NcoI,  
 Isolation des grossen Restriktionsfragmentes,  
 Dephosphorylierung der 5' Enden,  
 Ligation mit synthetischer DNA aus  
 Oligos O 572, O 573, O 574, O 575, O 576 und O 577,  
 Transformation in E. coli

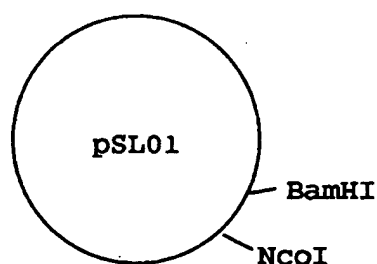
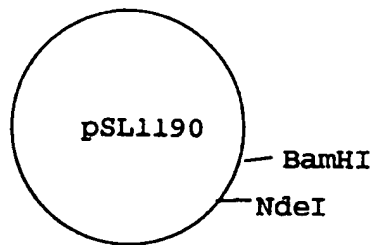


Abbildung 15



Verdauung mit BamHI und NdeI,  
 Isolation des grossen Restriktionsfragmentes,  
 Dephosphorylierung der 5' Enden,  
 Ligation mit synthetischer DNA aus  
 Oligos O 583, O 584, O 585 und O 586,  
 Transformation in E. coli

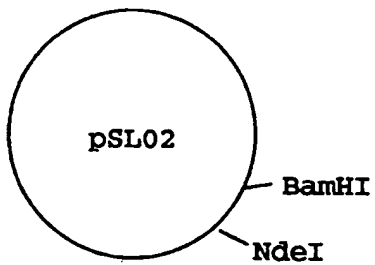


Abbildung 16

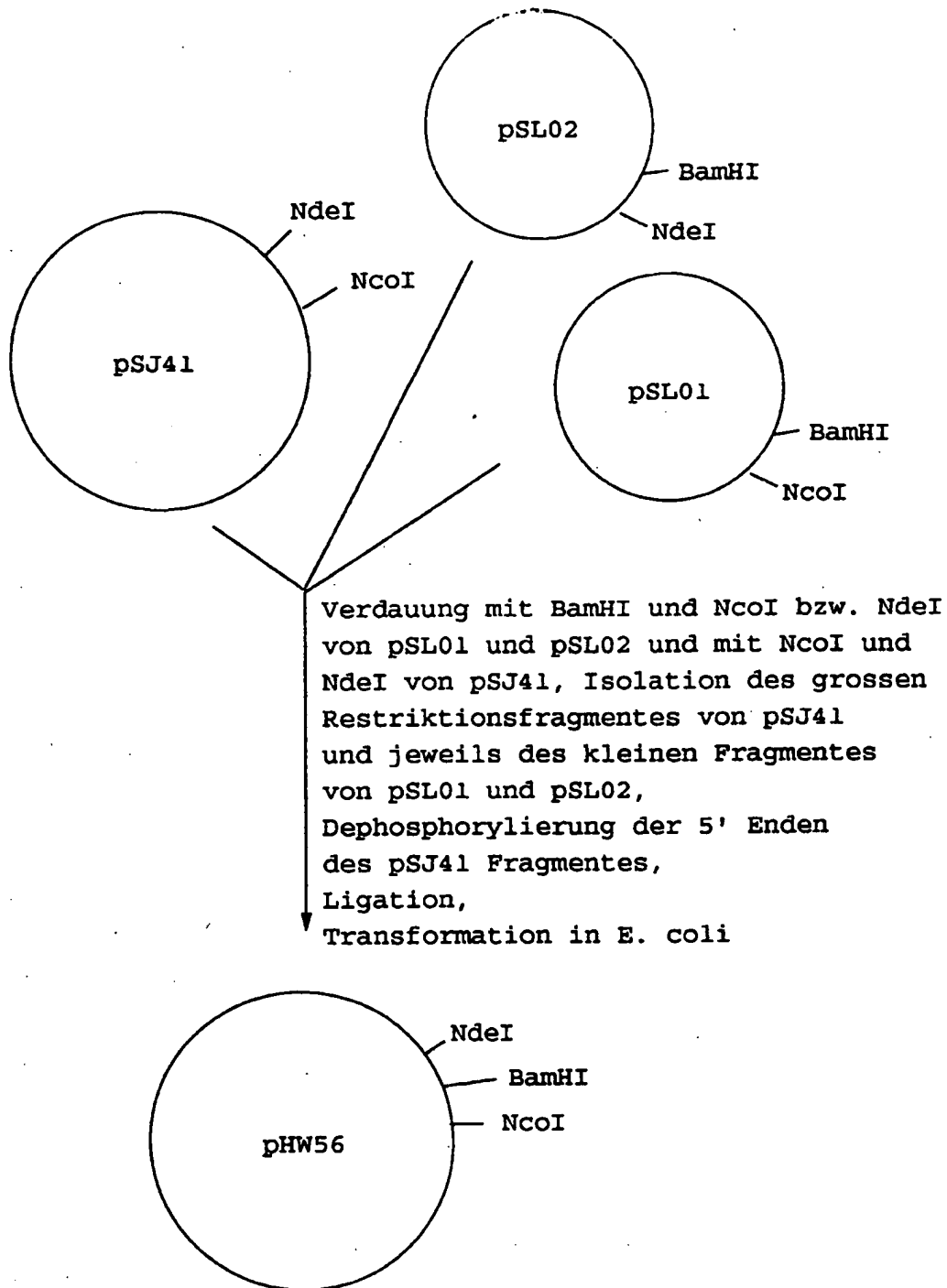


Abbildung 17



Abbildung 18: Aminosäuresequenz von M36 (SEQ ID NO:41)

Met-Ser-Lys-Thr-Cys-Tyr-Glu-Gly-Asn-Gly-His-Phe-Tyr-Arg-  
Gly-Lys-Ala-Ser-Thr-Asp-Thr-Met-Gly-Arg-Pro-Cys-Leu-Pro-  
Trp-Asn-Ser-Ala-Thr-Val-Leu-Gln-Gln-Thr-Tyr-His-Ala-His-  
Arg-Ser-Asp-Ala-Leu-Gln-Leu-Gly-Leu-Gly-Lys-His-Asn-Tyr-  
Cys-Arg-Asn-Pro-Asp-Asn-Arg-Arg-Arg-Pro-Trp-Cys-Tyr-Val-  
Gln-Val-Gly-Leu-Lys-Pro-Leu-Val-Gln-Glu-Cys-Met-Val-His-  
Asp-Cys-Ala-Asp-Gly-Lys-Lys-Pro-Ser-Ser-Pro-Pro-Glu-Glu-  
Leu-Lys-Phe-Gln-Cys-Gly-Gln-Lys-Thr-Leu-Arg-Pro-Arg-Phe-  
Lys-Ile-Ile-Gly-Gly-Glu-Phe-Thr-Thr-Ile-Glu-Asn-Gln-Pro-  
Trp-Phe-Ala-Ala-Ile-Tyr-Arg-Arg-His-Arg-Gly-Gly-Ser-Val-  
Thr-Tyr-Val-Cys-Gly-Gly-Ser-Leu-Ile-Ser-Pro-Cys-Trp-Val-  
Ile-Ser-Ala-Thr-His-Cys-Phe-Ile-Asp-Tyr-Pro-Lys-Lys-Glu-  
Asp-Tyr-Ile-Val-Tyr-Leu-Gly-Arg-Ser-Arg-Leu-Asn-Ser-Asn-  
Thr-Gln-Gly-Glu-Met-Lys-Phe-Glu-Val-Glu-Asn-Leu-Ile-Leu-  
His-Lys-Asp-Tyr-Ser-Ala-Asp-Thr-Leu-Ala-His-His-Asn-Asp-  
Ile-Ala-Leu-Leu-Lys-Ile-Arg-Ser-Lys-Glu-Gly-Arg-Cys-Ala-  
Gln-Pro-Ser-Arg-Thr-Ile-Gln-Thr-Ile-Cys-Leu-Pro-Ser-Met-  
Tyr-Asn-Asp-Pro-Gln-Phe-Gly-Thr-Ser-Cys-Glu-Ile-Thr-Gly-  
Phe-Gly-Lys-Glu-Asn-Ser-Thr-Asp-Tyr-Leu-Tyr-Pro-Glu-Gln-  
Leu-Lys-Met-Thr-Val-Val-Lys-Leu-Ile-Ser-His-Arg-Glu-Cys-  
Gln-Gln-Pro-His-Tyr-Tyr-Gly-Ser-Glu-Val-Thr-Thr-Lys-Met-  
Leu-Cys-Ala-Ala-Asp-Pro-Gln-Trp-Lys-Thr-Asp-Ser-Cys-Gln-  
Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Leu-Val-Cys-Ser-Leu-Gln-Gly-Arg-  
Met-Thr-Leu-Thr-Gly-Ile-Val-Ser-Trp-Gly-Arg-Gly-Cys-Ala-  
Leu-Lys-Asp-Lys-Pro-Gly-Val-Tyr-Thr-Arg-Val-Ser-His-Phe-  
Leu-Pro-Trp-Ile-Arg-Ser-His-Thr-Lys-Glu-Glu-Asn-Gly-Leu-  
Ala-Leu-Ser-Pro-Val-Val-Ala-Phe-Pro-Arg-Pro-Gly-Gly-Gly-  
Gly-Pro-Ser-Asp-Phe-Glu-Glu-Phe-Ser-Leu-Asp-Asp-Ile-Glu-  
Gln

Abbildung 19: Aminosäuresequenz von M 51 (SEQ ID NO:42)

Met-Ser-Asn-Glu-Leu-Asp-Pro-Arg-Pro-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-Pro-Asn-Asp-Lys-Tyr-Glu-Pro-Phe-Trp-Glu-Asp-Glu-Glu-Lys-Gly-Pro-His-Met-Ser-Ser-Pro-Pro-Glu-Glu-Leu-Lys-Phe-Gln-Cys-Gly-Gln-Lys-Thr-Leu-Arg-Pro-Arg-Phe-Lys-Ile-Ile-Gly-Gly-Glu-Phe-Thr-Thr-Ile-Glu-Asn-Gln-Pro-Trp-Phe-Ala-Ala-Ile-Tyr-Arg-Arg-His-Arg-Gly-Gly-Ser-Val-Thr-Tyr-Val-Cys-Gly-Gly-Ser-Leu-Ile-Ser-Pro-Cys-Trp-Val-Ile-Ser-Ala-Thr-His-Cys-Phe-Ile-Asp-Tyr-Pro-Lys-Lys-Glu-Asp-Tyr-Ile-Val-Tyr-Leu-Gly-Arg-Ser-Arg-Leu-Asn-Ser-Asn-Thr-Gln-Gly-Glu-Met-Lys-Phe-Glu-Val-Glu-Asn-Leu-Ile-Leu-His-Lys-Asp-Tyr-Ser-Ala-Asp-Thr-Leu-Ala-His-His-Asn-Asp-Ile-Ala-Leu-Leu-Lys-Ile-Arg-Ser-Lys-Glu-Gly-Arg-Cys-Ala-Gln-Pro-Ser-Arg-Thr-Ile-Gln-Thr-Ile-Cys-Leu-Pro-Ser-Met-Tyr-Asn-Asp-Pro-Gln-Phe-Gly-Thr-Ser-Cys-Glu-Ile-Thr-Gly-Phe-Gly-Lys-Glu-Asn-Ser-Thr-Asp-Tyr-Leu-Tyr-Pro-Glu-Gln-Leu-Lys-Met-Thr-Val-Val-Lys-Leu-Ile-Ser-His-Arg-Glu-Cys-Gln-Gln-Pro-His-Tyr-Tyr-Gly-Ser-Glu-Val-Thr-Thr-Lys-Met-Leu-Cys-Ala-Ala-Asp-Pro-Gln-Trp-Lys-Thr-Asp-Ser-Cys-Gln-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Leu-Val-Cys-Ser-Leu-Gln-Gly-Arg-Met-Thr-Leu-Thr-Gly-Ile-Val-Ser-Trp-Gly-Arg-Gly-Cys-Ala-Leu-Lys-Asp-Lys-Pro-Gly-Val-Tyr-Thr-Arg-Val-Ser-His-Phe-Leu-Pro-Trp-Ile-Arg-Ser-His-Thr-Lys-Glu-Glu-Asn-Gly-Leu-Ala-Leu

Abbildung 20: Aminosäuresequenz von M5112 (SEQ ID NO:43)

Met-Ser-Asn-Glu-Leu-Asp-Pro-Arg-Pro-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-  
Pro-Asn-Asp-Lys-Tyr-Glu-Pro-Phe-Trp-Glu-Asp-Glu-Glu-Lys-  
Gly-Pro-His-Met-Ser-Ser-Pro-Pro-Glu-Glu-Leu-Lys-Phe-Gln-  
Cys-Gly-Gln-Lys-Thr-Leu-Arg-Pro-Arg-Phe-Lys-Ile-Ile-Gly-  
Gly-Glu-Phe-Thr-Thr-Ile-Glu-Asn-Gln-Pro-Trp-Phe-Ala-Ala-  
Ile-Tyr-Arg-Arg-His-Arg-Gly-Gly-Ser-Val-Thr-Tyr-Val-Cys-  
Gly-Gly-Ser-Leu-Ile-Ser-Pro-Cys-Trp-Val-Ile-Ser-Ala-Thr-  
His-Cys-Phe-Ile-Asp-Tyr-Pro-Lys-Lys-Glu-Asp-Tyr-Ile-Val-  
Tyr-Leu-Gly-Arg-Ser-Arg-Leu-Asn-Ser-Asn-Thr-Gln-Gly-Glu-  
Met-Lys-Phe-Glu-Val-Glu-Asn-Leu-Ile-Leu-His-Lys-Asp-Tyr-  
Ser-Ala-Asp-Thr-Leu-Ala-His-His-Asn-Asp-Ile-Ala-Leu-Leu-  
Lys-Ile-Arg-Ser-Lys-Glu-Gly-Arg-Cys-Ala-Gln-Pro-Ser-Arg-  
Thr-Ile-Gln-Thr-Ile-Cys-Leu-Pro-Ser-Met-Tyr-Asn-Asp-Pro-  
Gln-Phe-Gly-Thr-Ser-Cys-Glu-Ile-Thr-Gly-Phe-Gly-Lys-Glu-  
Asn-Ser-Thr-Asp-Tyr-Leu-Tyr-Pro-Glu-Gln-Leu-Lys-Met-Thr-  
Val-Val-Lys-Leu-Ile-Ser-His-Arg-Glu-Cys-Gln-Gln-Pro-His-  
Tyr-Tyr-Gly-Ser-Glu-Val-Thr-Thr-Lys-Met-Leu-Cys-Ala-Ala-  
Asp-Pro-Gln-Trp-Lys-Thr-Asp-Ser-Cys-Gln-Gly-Asp-Ser-Gly-  
Gly-Pro-Leu-Val-Cys-Ser-Leu-Gln-Gly-Arg-Met-Thr-Leu-Thr-  
Gly-Ile-Val-Ser-Trp-Gly-Arg-Gly-Cys-Ala-Leu-Lys-Asp-Lys-  
Pro-Gly-Val-Tyr-Thr-Arg-Val-Ser-His-Phe-Leu-Pro-Trp-Ile-  
Arg-Ser-His-Thr-Lys-Glu-Glu-Asn-Gly-Leu-Ala-Leu-Ser-Pro-  
Val-Lys-Ala-Phe-Pro-Arg-Pro-Gly-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly-Asp-  
Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu

Abbildung 21: Aminosäuresequenz von M 43 (SEQ ID NO:44)

Met-Ile-Thr-Tyr-Thr-Asp-Cys-Thr-Glu-Ser-Gly-Gln-Asn-Leu-  
Cys-Leu-Cys-Glu-Gly-Ser-Asn-Val-Cys-Gly-Lys-Gly-Asn-Lys-  
Cys-Ile-Leu-Gly-Ser-Asp-Gly-Lys-Gly-Asn-Gln-Cys-Val-Thr-  
Gly-Glu-Gly-Thr-Pro-Lys-Pro-Glu-Ser-His-Asn-Asp-Gly-Asp-  
Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln-Ile-Ser-Lys-Thr-  
Cys-Tyr-Glu-Gly-Asn-Gly-His-Phe-Tyr-Arg-Gly-Lys-Ala-Ser-  
Thr-Asp-Thr-Met-Gly-Arg-Pro-Cys-Leu-Pro-Trp-Asn-Ser-Ala-  
Thr-Val-Leu-Gln-Gln-Thr-Tyr-His-Ala-His-Arg-Ser-Asp-Ala-  
Leu-Gln-Leu-Gly-Leu-Gly-Lys-His-Asn-Tyr-Cys-Arg-Asn-Pro-  
Asp-Asn-Arg-Arg-Arg-Pro-Trp-Cys-Tyr-Val-Gln-Val-Gly-Leu-  
Lys-Pro-Leu-Val-Gln-Glu-Cys-Met-Val-His-Asp-Cys-Ala-Asp-  
Gly-Lys-Lys-Pro-Ser-Ser-Pro-Pro-Glu-Glu-Leu-Lys-Phe-Gln-  
Cys-Gly-Gln-Lys-Thr-Leu-Arg-Pro-Arg-Phe-Lys-Ile-Ile-Gly-  
Gly-Glu-Phe-Thr-Thr-Ile-Glu-Asn-Gln-Pro-Trp-Phe-Ala-Ala-  
Ile-Tyr-Arg-Arg-His-Arg-Gly-Gly-Ser-Val-Thr-Tyr-Val-Cys-  
Gly-Gly-Ser-Leu-Ile-Ser-Pro-Cys-Trp-Val-Ile-Ser-Ala-Thr-  
His-Cys-Phe-Ile-Asp-Tyr-Pro-Lys-Lys-Glu-Asp-Tyr-Ile-Val-  
Tyr-Leu-Gly-Arg-Ser-Arg-Leu-Asn-Ser-Asn-Thr-Gln-Gly-Glu-  
Met-Lys-Phe-Glu-Val-Glu-Asn-Leu-Ile-Leu-His-Lys-Asp-Tyr-  
Ser-Ala-Asp-Thr-Leu-Ala-His-His-Asn-Asp-Ile-Ala-Leu-Leu-  
Lys-Ile-Arg-Ser-Lys-Glu-Gly-Arg-Cys-Ala-Gln-Pro-Ser-Arg-  
Thr-Ile-Gln-Thr-Ile-Cys-Leu-Pro-Ser-Met-Tyr-Asn-Asp-Pro-  
Gln-Phe-Gly-Thr-Ser-Cys-Glu-Ile-Thr-Gly-Phe-Gly-Lys-Glu-  
Asn-Ser-Thr-Asp-Tyr-Leu-Tyr-Pro-Glu-Gln-Leu-Lys-Met-Thr-  
Val-Val-Lys-Leu-Ile-Ser-His-Arg-Glu-Cys-Gln-Gln-Pro-His-  
Tyr-Tyr-Gly-Ser-Glu-Val-Thr-Thr-Lys-Met-Leu-Cys-Ala-Ala-  
Asp-Pro-Gln-Trp-Lys-Thr-Asp-Ser-Cys-Gln-Gly-Asp-Ser-Gly-  
Gly-Pro-Leu-Val-Cys-Ser-Leu-Gln-Gly-Arg-Met-Thr-Leu-Thr-  
Gly-Ile-Val-Ser-Trp-Gly-Arg-Gly-Cys-Ala-Leu-Lys-Asp-Lys-  
Pro-Gly-Val-Tyr-Thr-Arg-Val-Ser-His-Phe-Leu-Pro-Trp-Ile-  
Arg-Ser-His-Thr-Lys-Glu-Glu-Asn-Gly-Leu-Ala-Leu

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

**EP 0 712 934 A3**

(12)

**EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

(88) Veröffentlichungstag A3:  
23.08.2000 Patentblatt 2000/34

(43) Veröffentlichungstag A2:  
22.05.1996 Patentblatt 1996/21

(21) Anmeldenummer: 95117316.0

(22) Anmeldetag: 03.11.1995

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>: **C12N 15/62**, C12N 9/72,  
C12N 9/64, C07K 14/81,  
C07K 14/815, C07K 14/705,  
A61K 38/49, A61K 38/57,  
A61K 38/58

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU MC NL  
PT SE**  
Benannte Erstreckungsstaaten:  
**LT LV SI**

(30) Priorität: 17.11.1994 DE 4440892

(71) Anmelder: Grünenthal GmbH  
52078 Aachen (DE)

(72) Erfinder:  
• Wnendt, Stephan, Dr.  
D-52076 Aachen (DE)  
• Heinzel-Wieland, Regina, Dr.  
D-64295 Darmstadt (DE)  
• Steffens, Gerd Josef, Prof. Dr.  
D-52072 Aachen (DE)

(54) **Proteine mit fibrinolytischen und gerinnungshemmenden Eigenschaften**

(57) Es werden Proteine mit fibrinolytischen und gerinnungshemmenden Eigenschaften beschrieben, die am N- und/oder C-terminalen Ende der Plasminogen aktivierenden Aminosäuresequenz mit einer Thrombin oder Faktor Xa hemmenden Aminosäuresequenz verknüpft sind. Die Proteine, die gentechnisch hergestellt werden, eignen sich als Thrombolytika.

**EP 0 712 934 A3**



Europäisches  
Patentamt

# EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung  
EP 95 11 7316

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
X	PHANEUF MATTHEW D ET AL: "Covalent linkage of streptokinase to recombinant hirudin: A novel thrombolytic agent with antithrombotic properties." THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS 1994, Bd. 71, Nr. 4, 1994, Seiten 481-487, XP000909444 ISSN: 0340-6245 * Zusammenfassung * * siehe Seite 8, Zeilen 25-30 der vorliegenden Beschreibung *	1,2,5-7, 13,14	C12N15/62 C12N9/72 C12N9/64 C07K14/81 C07K14/815 C07K14/705 A61K38/49 A61K38/57 A61K38/58
E	EP 0 714 982 A (GRUENENTHAL GMBH) 5. Juni 1996 (1996-06-05) * das ganze Dokument *	1-14	
A	EP 0 365 468 A (CIBA GEIGY AG ;UCP GEN PHARMA AG (CH)) 25. April 1990 (1990-04-25) * Seite 10, Zeile 2-5 *	1-14	
T	LIJNEN H R ET AL: "Functional properties of a recombinant chimeric protein with combined thrombin inhibitory and plasminogen -activating potential." EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, (1995 NOV 15) 234 (1) 350-7. , XP000887319 * das ganze Dokument *	1-14	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.6) C07K C12N A61K
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort <b>MÜNCHEN</b>		Abschlußdatum der Recherche <b>24. Mai 2000</b>	Prüfer <b>Herrmann, K</b>
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichttechnische Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

EPO FORM 1503 (03.82) (P04003)

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT  
ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 95 11 7316

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentedokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Daten des Europäischen Patentamts am  
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

24-05-2000

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0714982 A	05-06-1996	DE 4442665 A	05-06-1996
		CA 2163925 A	31-05-1996
		FI 955755 A	31-05-1996
		JP 8231595 A	10-09-1996
		ZA 9510154 A	06-05-1996
EP 0365468 A	25-04-1990	AT 101524 T	15-03-1994
		AU 628854 B	24-09-1992
		AU 4135289 A	29-03-1990
		CA 1336493 A	01-08-1995
		DE 68913132 D	24-03-1994
		DE 68913132 T	07-07-1994
		DK 463989 A	22-03-1990
		IE 62434 B	08-02-1995
		IL 91706 A	13-07-1997
		JP 2121934 A	09-05-1990
		KR 149001 B	15-10-1998
		NZ 230691 A	26-03-1992
		PH 27420 A	21-06-1993
		US 5126134 A	30-06-1992
		ZA 8907173 A	26-09-1990

EPO FORM P0481

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82